

**Untersuchungen zur subzellulären Dynamik, Funktion und
Aktivität von Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls während
der Zell-Zell-Kommunikation in *Neurospora crassa***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Julia Illgen
aus Lüneburg

1. Referent:	Professor Dr. André Fleißner
2. Referent:	Professor Dr. Norbert F. Käufer
eingereicht am:	03.05.2017
mündliche Prüfung (Disputation) am:	24.07.2017
Druckjahr 2018	

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Serrano, A., Hammadeh HH., Herzog S., Illgen, J., Schumann, M.R., Weichert, M., & Fleißner A. The dynamics of signal complex formation mediating germling fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology* 101: 31-33 (2017).

Dettmann, A., Illgen, J., März, S., Schürg, T., Fleißner A., & Seiler, S. The ndr kinase scaffold hym1/mo25 is essential for mak2 map kinase signaling in *Neurospora crassa*. *PLoS Genetics* 8(9):e1002950 (2012).

Tagungsbeiträge

Illgen, J.: Subcellular localization of the *Neurospora crassa* MAP Kinase MAK-2 influences its activity and function during cell-cell signalling. (Vortrag) 44th Annual Conference of the German Genetics Society (GfG), Braunschweig (2013).

Illgen, J.: Subcellular localization of the *Neurospora crassa* MAP Kinase MAK-2 influences its activity and function during cell-cell signalling. (Vortrag) 11th European conference on fungal genetics, Marburg (2012).

Illgen, J.: Subcellular Localization Influences the Activity and Function of the MAP Kinase MAK-2 in Cell Signalling in *N. Crassa*. (Poster) 10th VAAM-Symposium, Marburg (2011).

Meinem Mann und meinen Kindern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1. Einleitung	1
1.1. Die Bedeutung von Zellfusionen für die Entwicklung von Lebewesen	1
1.2. Molekulare Grundlagen der Zellfusion am Beispiel des <i>Yeast Mating Pheromone Pathways</i>	4
1.3. <i>Neurospora crassa</i> als Modellorganismus	9
1.4. Zellfusionen in <i>N. crassa</i>	13
1.4.1. Vegetativer Lebenszyklus von <i>N. crassa</i>	14
1.4.2. Sexueller Lebenszyklus von <i>N. crassa</i>	16
1.4.3. Molekulare Grundlagen der Zellfusion in <i>N. crassa</i>	17
1.5. Ziel der Arbeit	24
2. Material und Methoden	27
2.1. Materialien	27
2.1.1. Verwendete <i>N. crassa</i> -Stämme	27
2.1.2. Plasmide	30
2.1.3. Verwendete Primer	31
2.1.4. Chemikalien und Enzyme	32
2.1.5. Antikörper	33
2.1.6. Puffer und Lösungen	33
2.1.7. Nährmedien	35
2.2. Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1. Klonierungsstrategien	38
2.2.2. <i>Polymerase chain reaction</i> , PCR	40
2.2.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	41
2.2.4. Gelextraktion von DNA	41
2.2.5. Restriktionsverdau	41
2.2.6. Ligation	42
2.2.7. Transformation in <i>E. coli</i> XL1-Blue	42
2.2.8. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
2.2.9. Isolierung genomischer DNA aus <i>N. crassa</i>	44
2.2.10. Bestimmung der DNA-Konzentration	45
2.2.11. DNA-Sequenzierung	45
2.3. Biochemische Methoden	46
2.3.1. Proteinextraktion aus <i>N. crassa</i>	46
2.3.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	47
2.3.3. Coomassie-Färbung	48
2.3.4. Western-Blot	48
2.3.5. <i>Stripping</i> der PVDF-Membran	50
2.4. Methoden zur Kultivierung und Analyse von <i>N. crassa</i>	51
2.4.1. Kultivierung und Lagerung von <i>N. crassa</i>	51

2.4.2.	Transformation in <i>N. crassa</i>	52
2.4.3.	Einzelsporisolierung	53
2.4.4.	Kreuzungen	53
2.4.5.	Bildung heterokaryotischer Stämme	54
2.4.6.	Mikroskopische Untersuchungen	55
2.4.7.	Quantifizierungen	57
3.	Ergebnisse	61
3.1.	Lokalisierung der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade-Komponenten in Keimlingen	61
3.1.1.	MAK-2-GFP zeigt eine oszillierende Dynamik in interagierenden Keimlingen	61
3.1.2.	MEK-2-GFP lokalisiert in interagierenden Keimlingen mit einer ähnlichen subzellulären Dynamik wie MAK-2	62
3.1.3.	NRC-1-GFP akkumuliert am Berührungspunkt interagierender Keimlinge	63
3.1.4.	Co-Lokalisierungen von Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade	66
3.2.	Lokalisierung der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade-Komponenten in reifen Hyphen	70
3.2.1.	MAK-2 akkumuliert in reifen Hyphen cytoplasmatisch, an den Septenporen und in den Zellkernen	71
3.2.2.	MEK-2 akkumuliert in reifen Hyphen um die Septenporen	72
3.2.3.	NRC-1 akkumuliert in reifen Hyphen um die Septenporen	76
3.3.	Artifizielle Missrekrutierung von Komponenten der MAP-Kinasen-Kaskade	78
3.3.1.	Der <i>tef-1</i> -Promotor ist ein geeigneter Promotor für die Visualisierung von MAK-2-GFP-CAAX-Fusionsproteinen in Keimlingen	79
3.3.2.	Einführung einer SAAX-Kontrolle	82
3.3.3.	Die subzelluläre Dynamik von MAK-2 ist essentiell für die Funktion der Kinase	96
3.3.4.	Membrangebundenes MAK-2 hat einen dominant negativen Effekt im Wildtyp-Hintergrund	105
3.3.5.	Membranverankerung führt zu einer Hyperphosphorylierung von MAK-2-GFP-CAAX	110
3.3.6.	Membrangebundenes MEK-2-GFP-CAAX komplementiert den Deletionsphänotyp der $\Delta mek-2$ -Mutante partiell	116
3.3.7.	Überexpression von membrangebundenem MEK-2 wirkt sich negativ auf Keimlingsinteraktionen aus	129
3.3.8.	Natives MAK-2 wird in <i>mek-2-gfp-caax</i> -exprimierenden Stämmen phosphoryliert	139
3.3.9.	MEK-2-GFP-CAAX ermöglicht eine sexuelle Differenzierung	142
4.	Diskussion	151
4.1.	Lokalisation von Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade	151
4.1.1.	Die Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls oszillieren synchron an die Spitzen interagierender Keimlinge	152
4.1.2.	Die Genexpression von <i>nrc-1</i> und <i>mek-2</i> wird vermutlich auf unterschiedlichen Ebenen reguliert	154
4.1.3.	Unterschiedliche physiologische Konzentrationen der Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls tragen möglicherweise zur Sensitivität der Signaltransduktion bei	155
4.1.4.	MEK-2 könnte teilweise unabhängig von HAM-5 an die Plasmamembran rekrutiert werden	156
4.1.5.	Möglicherweise erfüllen die Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls weitere Aufgaben am zukünftigen Fusionspunkt	157

4.1.6. Septen - eine Signalplattform	158
4.2. Misslokalisierung von Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade	161
4.2.1. Die subzelluläre Dynamik von MAK-2 ist essentiell für die Funktionen der Kinase	162
4.2.2. Die subzelluläre Dynamik von MEK-2 ist nicht essentiell für vegetative Zellfusionen	164
4.2.3. Artifizuell membrangebundenes MAK-2 liegt hyperphosphoryliert vor	165
4.2.4. Die künstliche Membranrekrutierung von MEK-2-GFP-CAAX könnte eine zeitliche Regulierung der MAK-2-Aktivität stören	166
4.2.5. Destabilisierung von MAK-2 und MEK-2 an der Plasmamembran könnte als negativer Regulationsmechanismus wirken	168
4.2.6. Verschiedene Promotoren bieten unterschiedliche Vor- und Nachteile für eine Expression in <i>N. crassa</i>	170
4.2.7. Menge und Aktivierungsstatus von MAK-2 und MEK-2 tragen vermutlich zur Spezifität der Zellantwort bei	172
4.2.8. Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade könnten direkt mit Komponenten des Polarisoms interagieren und das gerichtete Wachstum interagierender Keimlinge vermitteln	174
4.2.9. Regulation der vegetativen und sexuellen Zell-Zell-Kommunikation	178
4.3. Der „Zelldialog“: Spezifität und Robustheit durch zeitlich-räumliche Koordinations-Mechanismen	180
5. Zusammenfassung	189
Literaturverzeichnis	191
A. Anhang	205
A.1. Messwerte und statistische Auswertung	205
A.1.1. MT-21-643 und MT-22-640	205
A.1.2. MT-17-353 und MT-19-378	216
A.1.3. MT-42-279, MT-43-286 und MT-43-287	222
A.1.4. MT-29-249 und MT-35-330	234
A.2. Plasmidkarten	242

Abbildungsverzeichnis

1.1. Drei Zellfusionstypen	3
1.2. <i>Mating</i> in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	5
1.3. Modell der intrazellulären Signaltransduktion während des <i>Matings</i> in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	6
1.4. Zellfusionen im Lebenszyklus von <i>N. crassa</i>	15
1.5. Oszillierende Lokalisierung von SO und MAK-2 an den Spitzen interagierender Keimlinge	23
2.1. Schematische Darstellung des Plasmid pMF272 zur homologen Integration am <i>his-3</i> -Lokus von <i>N. crassa</i>	39
3.1. Subzelluläre Dynamik von MAK-2-GFP in interagierenden Keimlingen	62
3.2. Subzelluläre Lokalisierung von MEK-2-GFP in interagierenden Keimlingen	64
3.3. Subzelluläre Lokalisierung von NRC-1-GFP in interagierenden Keimlingen	65
3.4. Co-Lokalisierung von MAK-2- und MEK-2-Fluoreszenzproteinen	68
3.5. Co-Lokalisierung von MAK-2 und MEK-2 am Fusionspunkt	69
3.6. Co-Lokalisierung von MAK-2-CHERRY und NRC-1-GFP am Berührungspunkt	70
3.7. MAK-2 lokalisiert in reifen Hyphen cytoplasmatisch	72
3.8. Promotorabhängige Lokalisierung von MAK-2 an der Spitze wachsender Hyphen	73
3.9. Co-Lokalisierung von MEK-2-GFP und H1-dsRED	75
3.10. MEK2-GFP akkumuliert an den Septenporen reifer Hyphen	75
3.11. MEK2-GFP akkumuliert nicht an den Spitzen wachsender Hyphen	76
3.12. NRC1-GFP akkumuliert an den Septenporen reifer Hyphen	77
3.13. Expression von <i>mak-2-gfp-caax</i> in reifen Hyphen unter der Verwendung unterschiedlicher Promotoren	81
3.14. Expression von <i>mak-2-gfp-caax</i> in Keimlingen unter der Verwendung unterschiedlicher Promotoren	83
3.15. Vergleichende Lokalisation von überexprimiertem MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX im Wildtyp-Hintergrund	86
3.16. Vergleichende Lokalisation von MAK-2-CHERRY- und MAK-2-GFP-SAAX-Fusionsproteinen, die mit Hilfe des nativen Promotors im Wildtyp-Hintergrund exprimiert wurden	88
3.17. Vergleichende Lokalisation von überexprimiertem MAK-2-GFP und MAK-2GFP-SAAX im $\Delta mak-2$ -Hintergrund	90
3.18. Vergleichende Lokalisation von überexprimiertem MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX in reifen Hyphen	91
3.19. Vergleichende Lokalisation von MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX, die mit Hilfe des nativen Promotors im <i>mak-2</i> -Deletionshintergrund exprimiert wurden	94
3.20. Vergleichende Hyphenlokalisation von MAK-2-GFP- und MAK-2-GFP-SAAX-Fusionsproteinen, die mit Hilfe des nativen <i>mak-2</i> -Promotors exprimiert wurden	95
3.21. Promotorabhängige Lokalisierung von MAK-2-GFP-CAAX und MAK-2-GFP-SAAX in Keimlingen und reifen Hyphen	99
3.22. Quantifizierung makroskopischer Merkmale der Stämme MT-21-643 und MT-22-640	102
3.23. Quantifizierung von Keimlingsinteraktionen in den Stämmen MT-21-643 und MT-22-640	104

3.24. Quantifizierung von makroskopischen Merkmalen der Stämme MT-17-353 und MT-19-378	108
3.25. Quantifizierung der Keimlingsinteraktionen und untypischen Zellkontakte in den Stämmen MT-17-353 und MT-19-378	111
3.26. Membranrekrutierung von MAK-2 führt zur Hyperphosphorylierung der Kinase	114
3.27. Promotorabhängige Lokalisation von MEK-2-GFP und MEK-2-GFP-CAAX in Hyphen und nicht-interagierenden Keimlingen	118
3.28. MEK-2-GFP oszilliert im $\Delta mek-2$ -Hintergrunde an den Spitzen interagierender Keimlinge	119
3.29. Quantifizierung makroskopischer Merkmale der Stämme MT-42-279, MT-43-286 und MT-43-287	122
3.30. Mikroskopische Untersuchungen von Keimlingen, die <i>mek-2-gfp-caax</i> im $\Delta mek-2$ -Hintergrund exprimieren	125
3.31. Entwicklung von Sporen des Wildtyps und des Stammes MT-43-286	128
3.32. Hyphenfusionen des Wildtyps und der Stämme MT-43-286 und MT-43-287	129
3.33. Promotorabhängige Lokalisation von MEK-2-GFP-C/SAAX im Wildtyp-Hintergrund	132
3.34. Subzelluläre Lokalisation von überexprimiertem MEK-2-GFP-SAAX in interagierenden Keimlingen	133
3.35. Quantifizierung charakteristischer Merkmale in den Stämmen MT-29-249 und MT-35-330	135
3.36. Mikroskopische Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen in den Stämmen MT-29-249 und MT-35-330	138
3.37. Western-Analyse zur Detektion von phosphoryliertem MAK-2 in <i>mek-2-gfp-caax</i> -exprimierenden Stämmen	141
3.38. Beobachtung der sexuellen Entwicklung der Stämme MT-43-286 und MT-35-330	146
3.39. Beobachtung morphologisch veränderter Perithezien nach 15 und 19 Tagen Inkubationszeit	147
3.40. Keimung von <i>mak-2-gfp-caax</i> und <i>mek-2-gfp-caax</i> -exprimierenden Asko-sporen	150
4.1. Netzwerktopologie im räumlichen Kontext	160
4.2. Das Modell des „Zelldialogs“	182

Tabellenverzeichnis

2.1. Liste aller in dieser Arbeit verwendeten <i>N. crassa</i> -Stämme	27
2.2. Liste verwendeter Plasmide	30
2.3. Liste verwendeter Primer	31
2.4. In dieser Arbeit verwendete Antikörper	33
2.5. Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen	33
2.6. Nährmedien für die Kultivierung von <i>N. crassa</i> und <i>E. coli</i>	35
2.7. Standardisierte PCR-Ansätze und Programme	40
2.8. Standardisierte Restriktions-Ansätze	42
2.9. Standardisierter Ligations-Ansatz	43
2.10. Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele	47

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	<i>Bovine Serum albumin</i>
CRIB-Domäne	<i>Cdc42/Rac interaction binding domain</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
FGSC	Fungal Genetics Stock Center
FM4-64	N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)-phenyl)-hexatrienyl)-pyridiniumdibromid
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
kb	Kilobasen
MAPK(K)(K)	<i>Mitogen activated protein kinase (kinase) (kinase)</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
PAK	<i>p21-activated kinase</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin

1. Einleitung

1.1. Die Bedeutung von Zellfusionen für die Entwicklung von Lebewesen

Zell-Zell-Fusionen spielen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung mehrzelliger Lebewesen. Ein bekanntes Beispiel für eine Zellfusion ist die Verschmelzung von männlicher und weiblicher Keimzelle während der Befruchtung, der Beginn neuen Lebens. Während der Entwicklung der Zygote zu einem adulten Individuum und über die gesamte Lebensspanne finden weitere Zellfusionen statt. Hierdurch bilden sich mehrkernige Zellen, die sogenannten Syncytien. In tierischen Organismen spielen Zellfusionen eine Rolle bei der Bildung und dem Erhalt von Organen und Geweben, der Immunabwehr und der Entstehung von Krankheiten [Oren-Suissa and Podbilewicz, 2007; Willkomm and Bloch, 2015]. Beispielsweise fusionieren während der Differenzierung und Regeneration von Muskeln zehntausende von Myoblasten und bilden mehrkernige Muskelfasern [Ball and Goodman, 1985; Abmayr and Pavlath, 2012]. Auch während der Differenzierung der Linse im Auge von Wirbeltieren finden Zellfusionen statt, die zu mehrschichtigen Syncytien führen. Es wurde vorgeschlagen, dass diese eine wichtige Rolle beim Austausch von Proteinen in der Linse spielen [Shestopalov and Bassnett, 2000; Shi et al., 2009; Oren-Suissa and Podbilewicz, 2010]. Im Gegensatz zu diesen Zellfusions-Ereignissen, die einen essentiellen Schritt bei der Entwicklung der entsprechenden Organe darstellen, fusionieren Makrophagen selten und zu spezifischen Gelegenheiten. Der Zusammenschluss zu mehrkernigen Makrophagen vergrößert die Zellen und ermöglicht hierdurch den Abbau größerer Partikel, die einzelne Makrophagen auch in ihrer Gesamtheit nicht degradieren können [Chen et al., 2007]. Beispielsweise fusionieren Makrophagen im Knochen zu mehrkernigen Osteoclasten, die während der Embryonalentwicklung und der gesamten Lebensspanne eines Individuums eine bedeutende Rolle beim Knochenumbau spielen. In Anwesenheit von großen körperfremden Partikeln oder Pathogenen fusionieren Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen mit effizienten resorbierenden Eigenschaften [Anderson et al., 2008; Chen et al., 2007; Oren-Suissa and Podbilewicz, 2010]. Neben den vorteilhaften Auswirkungen

von Zellfusionen während der Bildung und Entwicklung von Organen und der Immunabwehr bergen sie auch Risiken für die Gesundheit. Durch die Fusion von Tumorzellen mit Stammzellen oder Leukozyten können deren Eigenschaften angenommen werden, was zu einer hohen Teilungsrate und Metastasenbildung führen und somit zur Entstehung von Krebs beitragen kann [Parris, 2015]. Da bestimmte Virus-Erkrankungen mit einem erhöhten Krebsrisiko verbunden sind, wird zudem vermutet, dass virale Fusionsproteine zur Fusion von Krebszellen und damit der Entstehung und Pathogenität von bösartigen Tumoren beitragen können [Gao and Zheng, 2011].

In adulten Hermaphroditen des Fadenwurms *C. elegans* liegen etwa 30 % der 959 somatischen Zellkerne in Syncytien vor, die durch Zellfusionen entstanden sind [Sulston et al., 1983; Podbilewicz and White, 1994]. Dieses Beispiel hebt die Bedeutung von Zellfusionen in tierischen Systemen hervor. Zellfusionen spielen darüber hinaus auch eine bedeutende Rolle für die Befruchtung, Entwicklung, Homöostase und Pathogenität anderer mehrzelliger Lebewesen, von Protisten über Pflanzen bis zu Pilzen [Aguilar et al., 2013]. Dabei wird grundsätzlich zwischen drei unterschiedlichen Zellfusionstypen unterschieden, die als *non-self fusion*, *self fusion* und *auto fusion* bezeichnet werden (Abbildung 1.1). Bei der *non-self fusion* handelt es sich um sexuelle Fusionsereignisse, bei denen Zellen unterschiedlicher Genotypen miteinander fusionieren. Im Gegensatz dazu steht die vegetative *self fusion*, bei der Zellen des gleichen Genotyps miteinander fusionieren. Im dritten Typ, der *auto fusion*, fusioniert eine Zelle mit sich selber. Während die *non-self fusion* dem Austausch von genetischem Material dient, tragen die *self fusion* und *auto fusion* zur Entstehung von Geweben, Organen und spezifischen Zellstrukturen bei [Oren-Suissa and Podbilewicz, 2010].

Die Untersuchung von Zellfusionen in verschiedenen Organismen, Zelltypen und Entwicklungsstadien hat gezeigt, dass es sich hierbei um einen komplexen Vorgang handelt, der genetisch exakt reguliert wird. Trotz aller Unterschiede in der Regulation und dem genauen Ablauf verschiedener Zellfusionsereignisse, finden alle Zellfusionen in drei grundlegenden Schritten statt: Zunächst differenzieren die Zellen zu fusionskompetenten Zellen. Dieser Schritt beinhaltet unter Anderem die Aufnahme und intrazelluläre Verarbeitung von extrazellulären Signalen, die zur Polarisierung der Fusionspartner und einer Annäherung durch Migration oder Wachstum führt. In einem zweiten Schritt binden die Zellen aneinander. Der dritte Schritt ist die eigent-

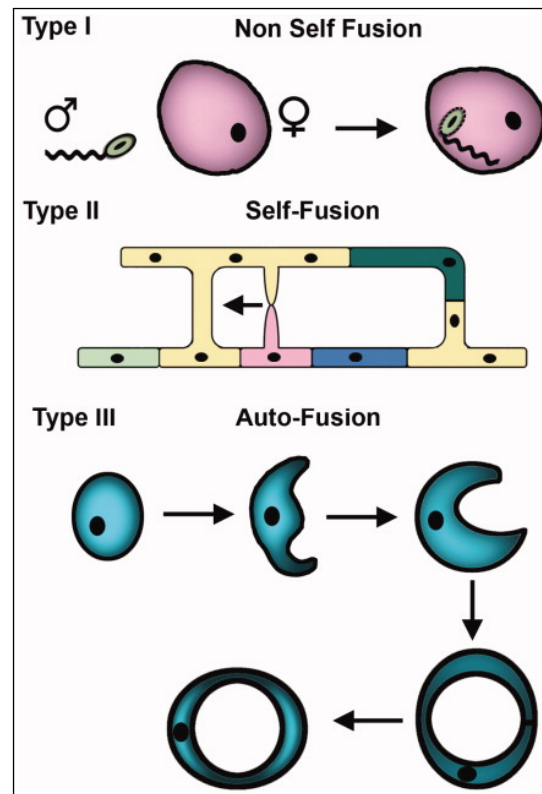


Abbildung 1.1.: Drei Zellfusionstypen

Zellfusionen können je nach Art der beteiligten Zellen in drei Typen unterteilt werden. Type 1: *non-self fusion*. In dieser Klasse fusionieren genetisch unterschiedliche Zellen miteinander. Type 2: *self fusion*. In dieser Klasse fusionieren genetisch identische Zellen miteinander. Diese können sich in dem gleichen oder einem anderen Entwicklungsstadium befinden. Type 3: *auto fusion*. In dieser Klasse fusionieren Zellen mit sich selber und bilden spezifische Zellstrukturen. Abbildung entnommen aus [Oren-Suissa and Podbilewicz, 2010].

liche Zellfusion, in der die Plasmamembranen der Fusionspartner sich miteinander verbinden und Cytoplasma durch die geöffnete Fusionspore geteilt wird. Im Anschluss an ein sexuelles Fusionsereignis findet immer eine Aufhebung der Fusionskompetenz statt, um weitere Zellfusionen zu verhindern. Dieser Schritt findet nach vegetativen Zellfusionen nicht zwingend statt und je nach Zelltyp können bereits fusionierte Zellen weitere Zellfusionen eingehen [Aguilar et al., 2013].

In den letzten zwei Jahrzehnten hat die Forschung an Zellfusionen einen Aufschwung erlebt. Wissenschaftler auf der ganzen Welt heben heute die Bedeutung von Zellfusionen für eine gesunde Entwicklung und die Entstehung von Krankheiten in allen höheren Lebewesen hervor. Trotz des hohen Stellenwerts und der klinischen Relevanz von Zellfusionsereignissen, bleiben

die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen weitestgehend unverstanden [Oren-Suissa and Podbilewicz, 2010; Willkomm and Bloch, 2015].

1.2. Molekulare Grundlagen der Zellfusion am Beispiel des *Yeast Mating Pheromone Pathways*

Eines der bestuntersuchten Zellfusionsereignisse ist das *Mating* in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* [Bardwell, 2005]. In der Hefe gibt es zwei Paarungstypen, *MATa* und *MAT α* . Haploide Zellen entgegengesetzten Paarungstyps fusionieren miteinander (*non-self fusion*), und bilden eine diploide *MATa/MAT α* -Zygote. Diese kann sich anschließend vegetativ durch Sprossung vermehren oder, induziert durch Stress wie Stickstoffmangel, eine Meiose durchlaufen und vier Sporen hervorbringen [Ydenberg and Rose, 2008]. Während des *Matings* durchlaufen die Hefezellen die typischen drei Phasen der Zellfusion (Abschnitt 1.1 und Abbildung 1.2).

Die molekularen Voraussetzungen für einen erfolgreichen Ablauf der Zellfusion wurden in der Hefe gründlich untersucht und eine umfassende Liste der beteiligten Faktoren erstellt [Bardwell, 2005]. Die Erkenntnisse aus der Hefe gelten als Referenzmodell für Zellfusionen in verschiedenen eukaryotischen Systemen und werden daher hier ausführlich beschrieben (Abbildung 1.3). Das *Mating* wird eingeleitet, wenn Pheromone des entgegengesetzten Paarungstyps an spezifischen Rezeptoren in der Plasmamembran binden. Bei den Pheromonen handelt es sich um kurze Peptide, die sich je nach Paarungstyp unterscheiden. Zellen des Paarungstyps *MAT α* sekretieren das Pheromon α -Faktor und produzieren gleichzeitig Rezeptoren, die das Pheromon **a**-Faktor des entgegengesetzten Paarungstyps erkennen. In den Zellen des Paarungstyps *MATa* ist es genau umgekehrt: Sie sekretieren den **a**-Faktor und erkennen mit Hilfe ihrer Rezeptoren das Pheromon α -Faktor [Jenness et al., 1983]. Bei den Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren, die sich in den *MATa*- und *MAT α* -Zellen voneinander unterscheiden [Burkholder and Hartwell, 1985; Nakayama et al., 1985]. Strukturell besteht diese Superfamilie von Rezeptoren aus 7 Transmembrandomänen, die eine Lokalisation in der Plasmamembran vermitteln. Intrazellulär sind die Rezeptoren mit einem trimeren G-Protein

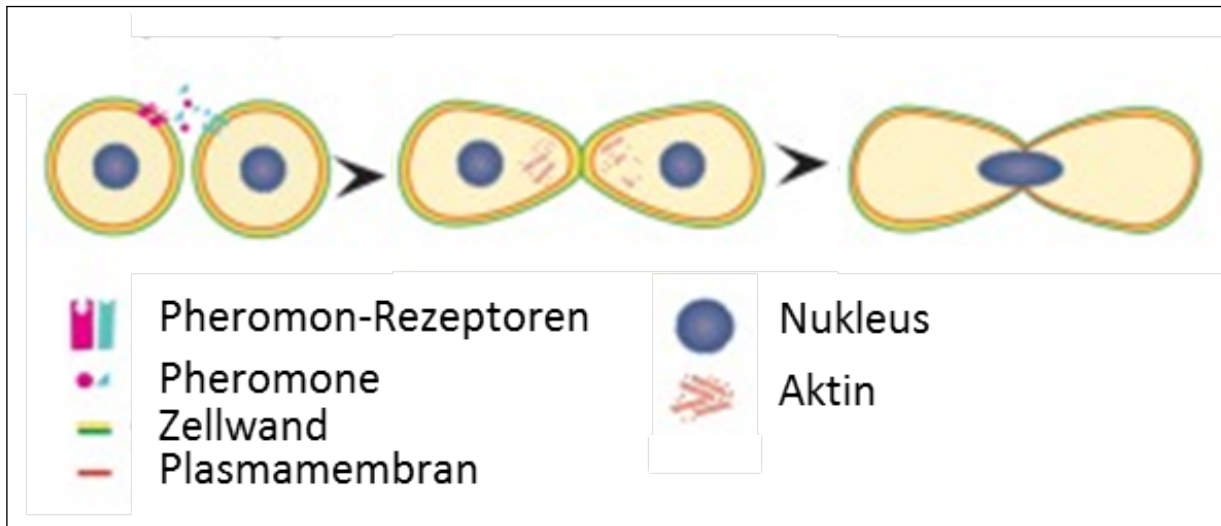


Abbildung 1.2.: Mating in der Hefe *S. cerevisiae*

Die erste Phase der Zellfusion, die Differenzierung zu fusionskompetenten Zellen, beinhaltet das Erkennen von Pheromonen des entgegengesetzten Paarungstyps. Hierdurch wird die Bildung polar wachsender *Mating*-Fortsätze induziert, den sogenannten *Shmoos*. Durch gezieltes Wachstum der *Shmoos* in Richtung der höchsten Pheromon-Konzentration etablieren die sessilen Hefezellen physischen Kontakt mit der Partnerzelle [Segall, 1993; Bardwell, 2005]. In der zweiten Phase der Zellfusion werden die Zellwände der Partnerzellen durch spezifische Adhäsions-Moleküle, die sogenannten Agglutinine, an der Kontaktstelle fest miteinander verbunden [Wickerham, 1958; Zhao et al., 2001]. Im Anschluss findet ein umfangreicher Umbau der Zellwand statt, wobei unter anderem die Zellwand an der Kontaktstelle zwischen den Partnerzellen abgebaut wird, so dass die Plasmamembranen sich berühren [Gammie et al., 1998; Chen et al., 2007]. Unmittelbar darauf folgend findet in der dritten Phase die eigentliche Zellfusion statt. Durch Verschmelzen der Plasmamembranen entsteht eine Fusionspore, durch die Cytoplasma und andere Zellinhaltsstoffe ausgetauscht werden [Heiman and Walter, 2000; Jin et al., 2004]. Nach der anschließend erfolgenden Karyogamie ist das *Mating* abgeschlossen. Die diploide Zelle kann sich im Anschluss vegetativ vermehren oder eine Meiose einleiten, durch die vier Sporen entstehen, die sich unter günstigen Umweltbedingungen ihrerseits vegetativ vermehren oder in Anwesenheit einer Partnerzelle wieder in den sexuellen Lebenszyklus eintreten und fusionieren können [Ydenberg and Rose, 2008]. Abbildung verändert nach [Merlini et al., 2013].

assoziiert [Bardwell, 2005]. Das trimere G-Protein und alle weiteren beteiligten Komponenten unterscheiden sich in *MATa*- und *MATα*-Zellen nicht voneinander. Nachdem ein Rezeptor das Pheromon des entgegengesetzten Paarungstyps bindet, katalysiert er den Austausch von GDP zu GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit des assoziierten trimere G-Proteins [Alvaro and Thorner, 2016]. Diese entlässt daraufhin das Heterodimer $G\beta\gamma$, welches die intrazelluläre Signalweiterleitung über eine MAP-Kinasen-Kaskade einleitet [Nomoto et al., 1990; Atay and Skotheim, 2017]. Dabei vermittelt die $G\gamma$ -Untereinheit die für diesen Schritt essentielle Membranassoziation über einen Palmitoyl- und Farnesylanker [Manahan et al., 2000], während $G\beta$ direkt mit drei wichtigen Effektoren interagiert: (1) Die PAK-Kinase Ste20 aktiviert die Fus3 MAP-Kinasen-Kaskade, die in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ste12 resultiert, der die Genexpres-

1. Einleitung

sion von über 200 *Mating*-spezifischen Genen reguliert. (2) Das Gerüstprotein Ste5 rekrutiert die Kinasen der Fus3 MAP-Kinasen-Kaskade an die Plasmamembran und bringt sie hierdurch in direkte räumliche Nähe zu der aktivierenden Kinase Ste20. (3) Das Gerüstprotein Far1 spielt eine Rolle beim Arrest interagierender Zellen in der G1-Phase des Zellzyklusses und bei der Ausrichtung des polaren Wachstums in Richtung des höchsten Pheromongradienten. [Roberts et al., 2000; Bardwell, 2005].

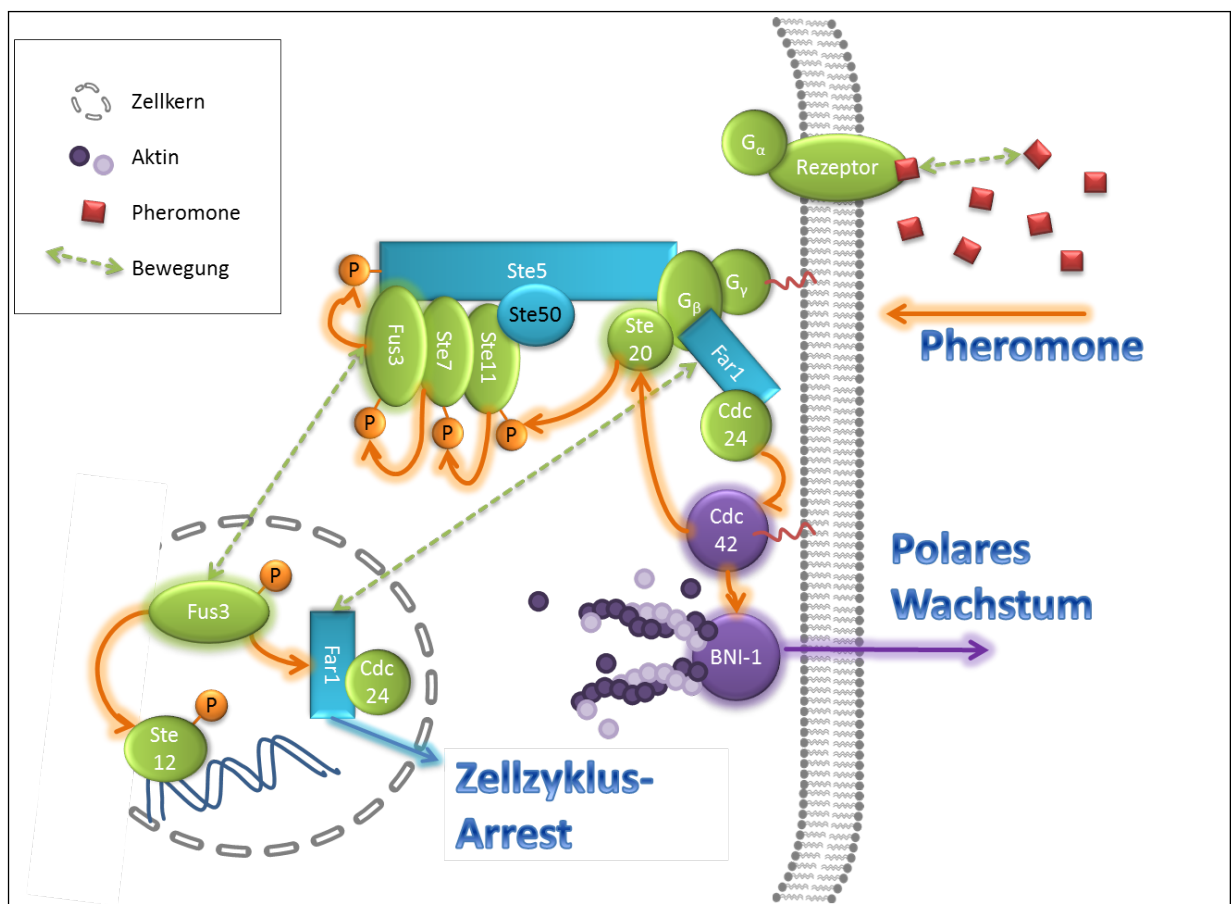


Abbildung 1.3.: Modell der intrazellulären Signaltransduktion während des *Matings* in der Hefe *S. cerevisiae*

Vereinfachte Darstellung der intrazellulären Signalweiterleitung während des Matings in der Hefe *S. cerevisiae*. Nach dem Erkennen von Pheromonen des entgegengesetzten Paarungstyps an der Zellmembran wird ein Signal über die Fus3 MAP-Kinasen-Kaskade ins Zellinnere weitergeleitet. Die aktivierte Kinase Fus3 wandert in den Zellkern, wo sie den Transkriptionsfaktor Ste12 und das Gerüstprotein Far1 reguliert. Far1 besitzt eine duale Funktion, die eng mit der subzellulären Lokalisation des Proteins verknüpft ist. Im Zellkern induziert phosphoryliertes Far1 den Zellzyklus-Arrest, während es an der Plasmamembran essentiell für die Ausrichtung der *Shmoos* in die Richtung der höchsten Pheromonkonzentration ist. Zur Vereinfachung der Grafik ist nur eine Hefezelle dargestellt. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Die Aktivierung der Fus3 MAP-Kinasen-Kaskade wird über die Rekrutierung von Ste20 und Ste5 an die Plasmamembran durch das Heterodimer $G\beta\gamma$ eingeleitet [Leeuw et al., 1998; Feng et al., 1998]. Ste20 ist eine PAK-Kinase, deren katalytisches Zentrum durch die CRIB-Domäne im N-Terminus der Kinase inhibiert wird [Lamson et al., 2002]. An der Plasmamembran interagiert die PAK-Kinase mit dem Adapterprotein Bem1. Bem1 ist gleichzeitig mit der aktivierten GTPase Cdc42 assoziiert, wodurch eine Aktivierung von Ste20 durch die GTPase Cdc42 vereinfacht wird [Moskow et al., 2000; Takaku et al., 2010; Alvaro and Thorner, 2016]. Cdc42 bindet an die CRIB-Domäne von Ste20, woraufhin das katalytische Zentrum der Kinase frei wird. Diese aktive Konformation wird vermutlich durch Autophosphorylierung der Kinase stabilisiert [Lamson et al., 2002]. Der dritte Effektor von $G\beta\gamma$ ist das Gerüstprotein Ste5, das die drei Kinasen des Fus3 MAP-Kinase-Moduls bindet und in Pheromon-stimulierten Zellen durch die Interaktion mit $G\beta\gamma$ an die Plasmamembran rekrutiert [Elion, 2001; Pryciak and Huntress, 1998; Bardwell, 2005].

MAP-Kinasen-Module sind ubiquitär vorhandene und in Pilzen, Pflanzen und Tieren hoch konservierte Signaltransduktionswege, die extrazelluläre Signale innerhalb der Zelle weiterleiten und eine angemessene Zellantwort auslösen. Die Kernkomponenten eines MAP-Kinase-Moduls sind drei Kinasen, die sich hierarchisch phosphorylieren und hierdurch aktivieren. Das oberste Glied dieser Kette ist eine MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK), welche die MAP Kinase Kinase (MAPKK) an zwei konservierten Threonin- oder Serinresten phosphoryliert. Die aktivierte MAPKK aktiviert anschließend die MAP Kinase (MAPK) durch die Phosphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosinrests. Aktivierte MAP Kinasen phosphorylieren zahlreiche Substrate, darunter Transkriptionsfaktoren, Proteine des Cytoskeletts, Phosphatasen und Kinasen, und regulieren hierdurch Metabolismus, Zellmorphologie, Zellzyklus und die Veränderung der Genexpression als Antwort auf eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli [Qi and Elion, 2005; Chen and Thorner, 2007]. Höhere Eukaryoten besitzen mehrere MAP-Kinasen-Module, die durch unterschiedliche externe Reize angesprochen werden und angemessene Zellantworten auslösen. Einige MAP-Kinasen-Module teilen sich Komponenten. Die Spezifität der Zellantwort kann unter anderem durch Gerüstproteine gewährleistet werden. Diese interagieren mit spezifischen Komponenten der MAP-Kinasen-Module, bestimmen die subzelluläre Lokalisation und

bringen Faktoren in räumliche Nähe zueinander, die für eine spezifische Zellantwort nötig sind [Garrington and Johnson, 1999].

Die Fus3 MAP-Kinasen-Kaskade aus *S. cerevisiae* besteht aus der MAPKKK Ste11, der MAPKK Ste7 und der MAPK Fus3 [Errede and Levin, 1993]. Alle drei Kinasen interagieren mit dem Gerüstprotein Ste5 und werden in Pheromon-stimulierten Zellen an die Plasmamembran rekrutiert [Marcus et al., 1994; Pryciak and Huntress, 1998]. Ste5 interagiert dabei mit dem Heterodimer $G\beta\gamma$ und mit dem Gerüstprotein Bem1, das mit der durch Cdc42 aktivierten PAK-Kinase Ste20 interagiert [Dowell et al., 1998; Lyons et al., 1996]. Durch diese zahlreichen Protein-Protein-Interaktionen gelangen Ste20 und Ste11 in räumliche Nähe, was eine Aktivierung von Ste11 durch Ste20 ermöglicht [Feng et al., 1998]. Die aktivierte MAPKKK Ste11 aktiviert die *Downstream*-Kinase Ste7, die wiederum die MAPK Fus3 aktiviert. Diese verlässt den Ste5-Komplex und phosphoryliert zahlreiche Substrate an der Plasmamembran, im Cytoplasma und im Zellkern [Gartner et al., 1992; Alvaro and Thorner, 2016].

Eine der Kernaufgaben von Fus3 ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ste12. Dieser interagiert mit den Proteinen Dig1 und Dig2 und liegt in diesem Komplex reprimiert vor. Aktiviertes Fus3 transloziert in den Nukleus, wo es Dig1 und Dig2 phosphoryliert, die daraufhin Ste12 aus der Repression entlassen [Tedford et al., 1997]. Ste12 wird ebenfalls von Fus3 phosphoryliert, was die Aktivität des Transkriptionsfaktors weiter steigert [Hung et al., 1997; Alvaro and Thorner, 2016]. Ste12 bindet an spezifische Promotorregionen und reguliert hierdurch Gene, die für den weiteren Verlauf des *Matings* eine Rolle spielen [Harrison and DeLisi, 2002]. Darunter befinden sich unter anderem Gene deren Produkte für die feste Verankerung der Partnerzellen (Agglutinine), für den Zellzyklus-Arrest (Far1) oder für die Zellfusion (Prm1) benötigt werden, aber auch deaktivierende Faktoren wie die Phosphatase Msg5 [Bardwell, 2005; Alvaro and Thorner, 2016]. Ein weiteres Gen, das durch Ste12 reguliert wird, ist *FUS3*, wodurch die Signalweiterleitung positiv verstärkt wird. Eine wichtige Komponente, die aktiviertes Fus3 phosphoryliert, ist das Gerüstprotein Far1. In phosphoryliertem Zustand inhibiert Far1 den G1-Cyclin-Cdk1-Komplex, wodurch die haploiden Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus verharren [Atay and Skotheim, 2017]. Ein weiteres Substrat von Fus3 ist das Formin Bni1, dessen Phosphorylierung das polarisierte Wachstum der *Shmoos* weiter fördert [Alvaro and Thorner, 2016].

Das polare Wachstum der *Shmoos* in Richtung des höchsten Pheromongradienten wird in der Hefe durch eine Ansammlung von Polaritätsfaktoren an der Plasmamembran initiiert, den sogenannten *Polarity Patches* [Atay and Skotheim, 2017]. Die Bildung der *Polarity Patches* wird durch Far1 beeinflusst, das in einem Komplex mit Cdc24, ein GTP-Austauschfaktor (*Guanine nucleotide exchange factors, GEF*) für die kleine Rho-GTPase Cdc42, vorliegt [Nern and Arkowitz, 1999]. In nicht-stimulierten Hefezellen befindet sich der Far1/Cdc24-Komplex hauptsächlich im Zellkern und teilweise im Cytoplasma und wird in Pheromon-stimulierten Zellen durch die Interaktion mit freiem $G\beta\gamma$ an die Plasmamembran rekrutiert. Hierdurch gelangt Cdc24 in räumliche Nähe zu der kleinen Rho-GTPase Cdc42, die über einen Geranylgeranylanker mit der Plasmamembran verbunden ist, und aktiviert diese. Aktiviertes Cdc42 rekrutiert das Gerüstprotein Bem1 an die Plasmamembran. Anschließend werden weitere Faktoren wie das an der Polymerisierung von Aktin beteiligte Protein Bni1 an die *Polarity Patches* rekrutiert, wodurch es zur Ausbildung von polarem Wachstum kommt [Kozubowski et al., 2008; Alvaro and Thorner, 2016].

In dem gut untersuchten Prozess des *Mating* in der Hefe *S. cerevisiae* ist ein Großteil der beteiligten Komponenten bekannt. Die Forschung der letzten 30 Jahren hat gezeigt, dass die einzelnen Komponenten eine Vielzahl von zeitlich und räumlich hoch dynamischen Interaktionen eingehen. Um dieses komplexe Netzwerk besser zu verstehen, wurden die Signalwege die zu polarem Wachstum und zur transkriptionellen Regulation durch Ste12 führen weitestgehend isoliert voneinander betrachtet. Dabei wurden die vielschichtigen Vernetzungen dieser Signalwege und ihre hohe Dynamik nicht ausreichend berücksichtigt. Trotz des breiten Wissens über die einzelnen Komponenten und Interaktionen fehlt für ein tiefergreifendes Verständnis daher bis heute ein vollständiges Bild, das die Gesamtheit der Signalwege während des *Mating* darstellt und in den allgemeinen Kontext weiterer vernetzter Signalwege in *S. cerevisiae* stellt [Bardwell, 2005; Atay and Skotheim, 2017].

1.3. *Neurospora crassa* als Modellorganismus

Zellfusionen spielen auch eine wichtige Rolle bei der vegetativen Entwicklung und der sexuellen Vermehrung des filamentösen Ascomyceten *Neurospora crassa* [Fleissner et al., 2008].

Pilze der Gattung *Neurospora* wurden erstmals 1843 in Frankreich, damals unter den Namen *Oïdium aurantiacum* und *Penicillium sitophilum*, als Kontaminant in französischen Bäckereien beschrieben. In den folgenden Jahrzehnten tauchte *Neurospora* meist unter dem Namen *Monilia sitophila* in Europa, Asien und Nordamerika als Kontaminant von Brot in Bäckereien, von Bagasse während der kommerziellen Gewinnung von Zuckersaft aus Zuckerrohr, von Laboratorien in der Mykologie und Pathologie und als Erstbesiedler nach Waldbränden auf. Erst im darauffolgenden Jahrhundert erfolgte anhand von Kreuzungsversuchen die heute noch gültige Einteilung der gefundenen Pilze in verschiedene Arten der neu benannten Gattung *Neurospora* [Shear and Dodge, 1927]. *Neurospora crassa* etablierte sich schnell als geeigneter Modellorganismus für genetische und biochemische Untersuchungen und war maßgeblich an der Entwicklung der „Ein-Gen-Ein-Enzym“-Hypothese von George Beadle und Edward Tatum beteiligt, die hierfür 1958 mit einem Nobelpreis ausgezeichnet wurden. Die damals durchgeführten Untersuchungen von biochemischen Mutanten in *N. crassa* gelten heute als einer der Grundsteine der Molekularbiologie [Beadle and Tatum, 1941; Davis and Perkins, 2002; Horowitz, 1991].

Die schnelle Etablierung von *Neurospora* als erfolgreicher Modellorganismus hat vielfältige Gründe. Wie die meisten Ascomyceten kann *N. crassa* sich vegetativ oder geschlechtlich vermehren. Bis auf eine kurze Phase während der sexuellen Fortpflanzung ist der Organismus haploid, was ihn zugänglich für klassische genetische Kreuzungsexperimente, Tetradenanalyse und molekularbiologische Analysen macht. Der Pilz lässt sich auf definiertem Minimalmedium einfach kultivieren und produziert dank des kurzen Lebenszyklus und der hohen Reproduktionsrate nach wenigen Tagen viele vegetative Sporen, die sogenannten Konidien. Auch der sexuelle Lebenszyklus ist kurz, sodass sich in wenigen Wochen viele Nachkommen generieren lassen. Erhaltene Stämme von *N. crassa* lassen sich einfach konservieren und benötigen bis zur erneuten Ausplattierung keine weitere Pflege. Dank der langen Tradition von *Neurospora* als Modellorganismus wurde im Laufe der Jahre ein breites Methodenspektrum entwickelt, angewandt und mit anderen Forschungsgruppen geteilt [Perkins, 1992; Davis and Perkins, 2002]. Seit den 1950er Jahren hat sich eine feste *Neurospora*-Gemeinschaft gebildet, die zu der Gründung des *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC) im Jahr 1960 führte. Eine wichtige Aufgabe des FGSC ist es, bekannte *Neurospora*-Mutanten zu konservieren und innerhalb der Forschungsgemeinschaft zu teilen. Zusätzlich wird die Kommunikation und der Austausch in-

nerhalb der *Neurospora*-Gemeinschaft seit 1962 durch den *Neurospora Newsletter* gefördert, der im Jahr 2008 in *Fungal Genetics Reports* umbenannt wurde. Inhaltlich wurde das FGSC um die Sammlung weiterer filamentöser Pilze und Methoden zur Handhabung erweitert, was den vermehrten Austausch zwischen Forschergruppen widerspiegelt, die diverse Fragestellungen an verschiedenen filamentösen Pilzen untersuchen. Ein Schwerpunkt des FGSC liegt dabei auf der Sammlung von Stämmen, die vollständig sequenziert sind. Im Jahr 2009 enthielt die Kollektion Vertreter von 113 verschiedenen Pilzarten, von denen 31 vollständig sequenziert sind. Das Hauptaugenmerk des FGSC liegt aber auch nach über 50 Jahren noch immer auf der Sammlung und Verteilung von *N. crassa*-Stämmen, was unter anderem auch mit der hohen Teilungsbereitschaft und dem wenig kompetitiven Umfeld der *Neurospora*-Gemeinschaft zu tun hat, deren Mitglieder bis zum Jahr 2009 über 20 000 Mutanten und Wildtyp-Isolate aus der ganzen Welt eingereicht haben [McCluskey et al., 2010; McCluskey, 2011; Davis and Perkins, 2002]. Aktuelle Fragestellungen in der *Neurospora*-Forschung umfassen Entwicklung, Photobiologie, zirkadianer Rhythmus, *Gene-Silencing*-Mechanismen, Ökologie und Evolution von *N. crassa* [Borkovich et al., 2004].

Ein wichtiger Meilenstein für die Forschung an *N. crassa* war die Veröffentlichung der vollständigen genomischen Sequenz im Jahr 2003. Das Genom ist etwa 43 Megabasen groß und auf 7 Chromosomen angeordnet. Durch manuelle und automatisierte Annotation wurden 10 082 proteinkodierende Gene vorhergesagt, die durchschnittlich 1,7 Introns aufweisen. Damit unterscheidet das Genom von *N. crassa* sich strukturell deutlich von dem Genom der Hefe *S. cerevisiae* mit etwa 6 300 proteinkodierenden Genen, die durchschnittlich 0,04 Introns enthalten, was auch die unterschiedliche biologische Komplexität von *N. crassa* widerspiegelt. Eine im Jahr 2003 durchgeführte Analyse der rund 10 000 vorhergesagten Proteinsequenzen zeigte überraschenderweise, dass 41 % davon keine signifikanten Übereinstimmungen zu den damals bekannten oder vorhergesagten Proteinen aus anderen Organismen aufweisen. Diese hohe Zahl unbekannter Proteine macht deutlich, dass unser Verständnis für die Biologie von *N. crassa* und anderen filamentösen Pilzen noch in den Kinderschuhen steckt und es viel Raum für interessante neue Entdeckungen gibt. Auf der anderen Seite weisen von den vorhergesagten Proteinen mit hohen Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen aus anderen Organismen viele besonders hohe Übereinstimmungen mit den entsprechenden Proteinen in Tieren oder Pflan-

zen auf. Von diesem Set an vorhergesagten Proteinen besitzen wiederum fast die Hälfte keine Ähnlichkeiten zu Proteinen aus der Hefe *S. cerevisiae*. Diese Daten zeigen, dass *N. crassa* auch biologische Mechanismen mit höheren Eukaryoten teilt, von denen einige in *S. cerevisiae* nicht vorhanden sind. Ein Beispiel hierfür könnte die Methylierung von DNA sein, die in Pflanzen, Tieren und *N. crassa* stattfindet, aber in der einzelligen Hefe *S. cerevisiae* nicht vorkommt [Galagan et al., 2003; Borkovich et al., 2004; Dunlap et al., 2007]. In den folgenden Jahren wurden die Genome von verschiedenen wildtypischen oder mutierten *N. crassa*-Stämmen und von einer Vielzahl weiterer filamentöser Pilze sequenziert, so dass heute über 75 genomische Sequenzen von mindestens 31 verschiedenen Arten öffentlich zugänglich sind [McCluskey, 2011; Wiest et al., 2013]. Die steigende Zahl bekannter Sequenzen ermöglicht einen Vergleich von Genomen, der auch als *comparative genomics* bezeichnet wird. Dabei kann der Vergleich mit Referenzsequenzen dabei helfen, die bei einer neuen Genomsequenzierung erhaltenen entschlüsselten Sequenzfragmente zusammenzufügen und das Genom zu annotieren [Nowrousian et al., 2004; Wiest et al., 2013]. Ein weiterer Anwendungsbereich ist die Identifizierung von Mutationen in den klassischen Mutanten der frühen genetischen Forschung, die phänotypisch beschrieben wurden aber auf Ebene der DNA zuvor unbekannt waren [McCluskey et al., 2011]. Durch *comparative genomics* können außerdem Gene mit spezifischen phänotypischen Unterschieden oder Gemeinsamkeiten zwischen den untersuchten Spezies in Zusammenhang gebracht werden und Anhaltspunkte für mögliche weitere Untersuchungen geben [Borkovich et al., 2004; Wiest et al., 2013].

Durch die Veröffentlichung des sequenzierten Genoms von *N. crassa* wurde eine Fülle von Daten erhältlich. Um die darin enthaltenen Informationen so gut wie möglich zu nutzen, hat sich eine internationale Kollaboration verschiedener Forschungseinrichtungen und Universitäten mit dem Ziel gebildet, die funktionelle Genomanalyse von *N. crassa* in vier zusammenhängenden Projekten voranzutreiben [Dunlap et al., 2007]. Ein bemerkenswertes Projekt dieser Kollaboration war die systematische Herstellung von *Knockout*-Mutanten für jedes annotierte Gen. Bis zum März 2017 wurden 12 891 Deletionsmutanten hergestellt (<http://www.fgsc.net/scripts/StrainSearchForm.asp>), die vermutlich einen großen Teil der annotierten Gene abdecken. Viele dieser Gene wurden in beiden Paarungstypen von *N. crassa* (*matA* und *mata*) ausgeschaltet, weshalb die Zahl der vorhandenen Mutanten die Anzahl der

annotierten Gene übertrifft. Alle im Zuge dieses Projekts hergestellten Deletionsmutanten befinden sich in der Sammlung des *FGSC* und sind somit für öffentliche und private Forschungseinrichtungen zugänglich [Colot et al., 2006; Dunlap et al., 2007; McCluskey and Wiest, 2011]. Nicht zuletzt durch diese und weitere Projekte ist *N. crassa* als Modellorganismus in den letzten Jahren weiter avanciert und dient heute als Referenzmodell für die Forschung in anderen filamentösen Pilzen und eröffnet Einblicke in Mechanismen, die auch in höheren Eukaryoten eine Rolle spielen. Eine Besonderheit von *N. crassa* ist dabei die feine Balance zwischen komplexer Biologie und einfacher Zugänglichkeit. Diese Besonderheit zeichnet den Pilz auch als geeigneten Modellorganismus für die Untersuchung von Zellfusionen aus.

1.4. Zellfusionen in *N. crassa*

Der komplexe Lebenszyklus von *N. crassa* weist vegetative und sexuelle Vermehrungsphasen auf, die experimentell einfach zugänglich und daher morphologisch gut beschrieben sind. In beiden Phasen finden Zellfusionsereignisse statt, so dass *self*- und *non-self*-Fusionen direkt in einem Organismus untersucht und miteinander verglichen werden können [Fleissner et al., 2008]. Während des vegetativen Lebenszyklus bildet *N. crassa* kolonieartige Myzelien. Diese bestehen aus langen Fäden, den sogenannten Hyphen, die polar durch Spitzenverlängerungen wachsen. Die Hyphen in der Peripherie der Kolonie wachsen nach außen und vermeiden Kontakt miteinander. In den inneren Bereichen der Kolonie bilden sich dagegen spezielle Fusionshyphen, die den Kontakt zu anderen Hyphen suchen und miteinander fusionieren. Durch diesen als Anastomose bezeichneten Prozess entsteht die typische vernetzte Struktur des Myzels [Koehler., 1930; Hickey et al., 2002]. Der physiologische Nutzen vegetativer Zellfusionen ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es wird aber vermutet, dass die allgemeine Fitness durch das Teilen von Organellen, Metaboliten, Nährstoffen und Signalmolekülen verbessert wird [Fleissner and Glass, 2007; Richard et al., 2012; Bastiaans et al., 2015].

Den sexuellen Lebenszyklus kann *N. crassa* als heterothallischer Organismus nur in Gegenwart eines Partners mit entgegengesetztem Paarungstyp vollständig durchlaufen [Shear and Dodge, 1927]. In *N. crassa* gibt es die beiden Paarungstypen *mata* und *matA*. Einer der beiden Stämme übernimmt bei einer Kreuzung den „weiblichen“ Part, der in der Bildung der typischen

Befruchtungsstrukturen liegt. Der als „männlich“ bezeichnete Partner trägt durch die Weitergabe seines Zellkerns zur Kreuzung bei. Die als Karyogamie bezeichnete Verschmelzung der Zellkerne und nachfolgende Produktion der sexuellen Askosporen findet innerhalb der Befruchtungsstrukturen statt [Raju, 1980; Kim et al., 2012]. Während der sexuellen Phase von *N. crassa* finden Zellfusion sowohl zwischen dem weiblichen und dem männlichen Kreuzungspartner, als auch zwischen Zellen des weiblichen Paarungspartners im Inneren der Reproduktionsstrukturen statt. Ob zusätzliche vegetative Zellfusionen bei der Bildung der Befruchtungsstrukturen eine Rolle spielen ist Gegenstand aktueller Diskussionen [Raju, 1980; Fleissner et al., 2008; Lichius et al., 2012a].

1.4.1. Vegetativer Lebenszyklus von *N. crassa*

Während der vegetativen Wachstumsphase (Abbildung 1.4, oberer Zyklus) bildet *N. crassa* asexuelle Sporen, die Konidien. Diese werden durch den Wind verteilt. Wenn sie auf einem geeigneten Substrat landen, keimen sie unter Bildung eines polaren Keimschlauches aus. Befinden sich zwei oder mehr Keimlinge in räumlicher Nähe zueinander, wachsen sie gerichtet aufeinander zu und fusionieren zu einer Einheit. Nach erfolgter Fusion bildet sich ein neuer Keimschlauch, sodass der Keimling weiter wachsen und mit anderen Keimlingen fusionieren kann. Es bildet sich ein verzweigtes Netzwerk, das sich schließlich zu einer reifen Kolonie entwickelt [Koehler., 1930; Roca et al., 2005; Fleissner and Serrano, 2016]. Die anfänglich schmalen Keimschläuche reifen zu adulten Hyphen, die durch Spitzenverlängerung und Verzweigung weiter wachsen. In regelmäßigen Abständen formen sich als Septen bezeichnete Querwände. Diese sind nicht vollständig geschlossen, sondern besitzen in der Mitte ein Loch, die sogenannte Pore, durch die Cytoplasma und Organellen frei passieren. In den inneren Bereichen der Kolonie formen sich Fusionshyphen, die gerichtet aufeinander zuwachsen und fusionieren, und somit zur Vernetzung der Kolonie beitragen. In den äußeren Bereichen der Kolonie finden dagegen keine Zellfusionen statt. Es wurde vermutet, dass das schnelle Wachstum der äußeren Hyphen zu einer raschen Erschließung von Nahrungsquellen dient und somit das Wachstum der Kolonie fördert, was im allgemeinen mit einer erhöhten Fitness einhergeht. Die Mechanismen die dazu führen, dass Leithyphen sich gegenseitig vermeiden während die Fusionshyphen im inneren der Kolonie gerichtet aufeinander zuwachsen sind nicht bekannt

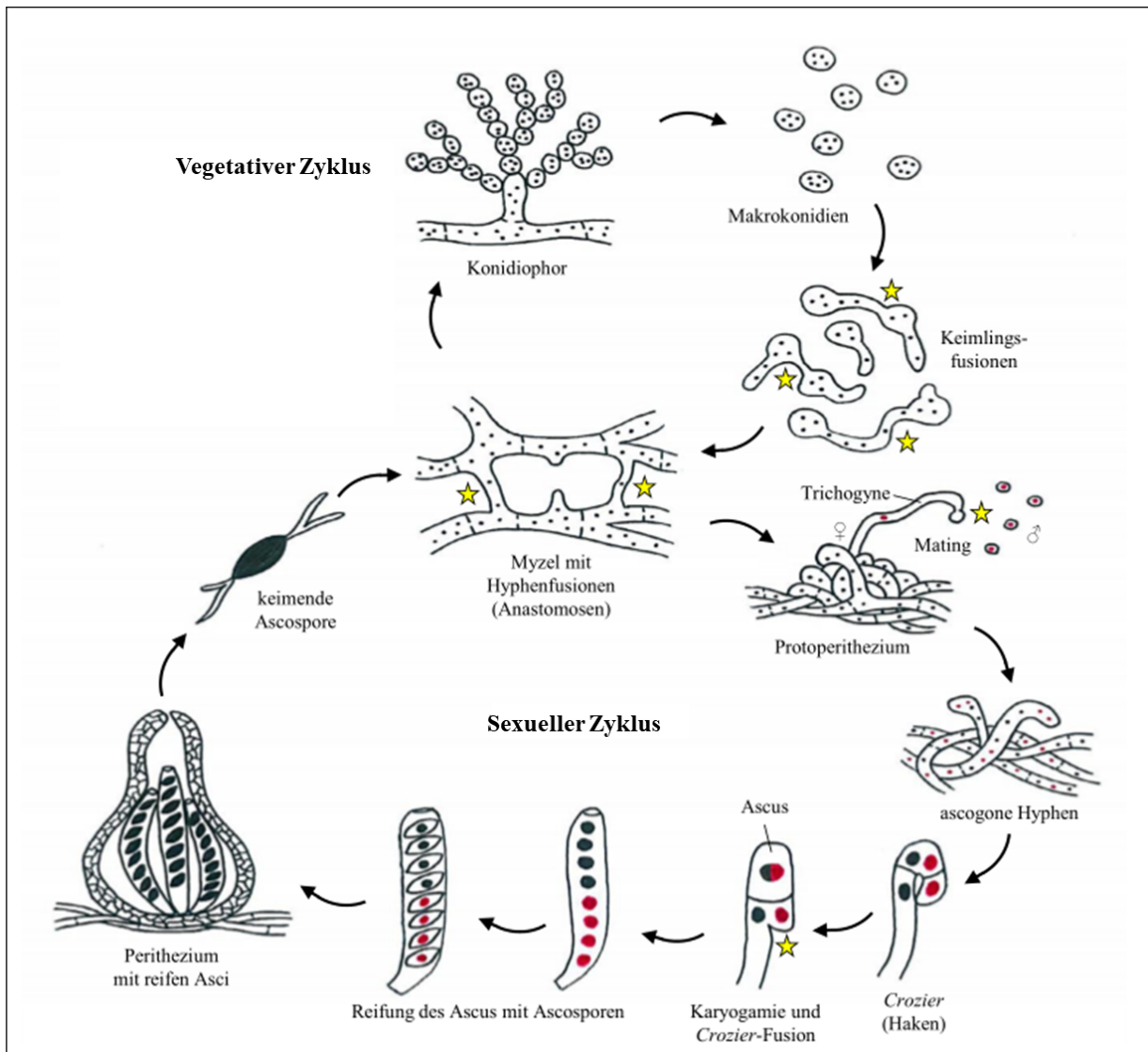


Abbildung 1.4.: Zellfusionen im Lebenszyklus von *N. crassa*

In der vegetativen Phase des Zellzyklusses (oberer Zyklus) produziert *N. crassa* Konidien, die nach der Keimung miteinander interagieren und fusionieren, wenn sie sich weniger als $15\mu\text{m}$ entfernt voneinander befinden [Lichius and Lord, 2014]. Es entwickelt sich ein reifes Myzel, in dessen inneren Bereichen Fusionshyphen miteinander interagieren und fusionieren. Während der sexuellen Reproduktionsphase (unterer Zyklus) findet die Fertilisation durch die Fusion einer Trichogyne mit einer Zelle des entgegengesetzten Paarungstyps statt, wobei die Trichogyne den Zellkern des Fusionspartners aufnimmt. Im Inneren des Protoperitheziums fusionieren Zellen des frühen Ascus, bevor die Karyogamie stattfindet. Die im Anschluss gebildeten Ascosporen werden aus dem reifen Perithezium entlassen und treten nach ihrer Keimung in den vegetativen Lebenszyklus ein. Die Fusionsereignisse sind mit gelben Sternchen markiert. Abbildung mit freundlicher Genehmigung verändert nach [Weichert, 2016].

[Koehler., 1930; Hickey et al., 2002; Fleissner and Serrano, 2016]. Darüber hinaus ist es Gegenstand aktueller Diskussionen, ob die Regulation der Keimlingsfusion und der Hyphenfusion gemeinsamen molekularen Mechanismen unterliegt, oder ob es sich um zwei getrennt voneinander regulierte Prozesse handelt. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass beide Prozesse gemeinsame Mechanismen der Regulation teilen und darüber hinaus noch spezifische Faktoren benötigen [Lichius and Lord, 2014; Fleissner and Serrano, 2016; Jonkers et al., 2016].

Besonders durch Trockenheit oder die Limitierung von Nährstoffen wird in der Kolonie von *N. crassa* die Produktion von Lufthyphen induziert. Einige Lufthyphen initiieren die Bildung von Konidien, indem sie ihr filamentöses Wachstum einstellen, anschwellen und schließlich mehrere apikale Knospen hintereinander bilden. Zwischen den entstandenen Konidien-Vorgängern werden Zellwände gebildet. Die Konidien bleiben aber zunächst verbunden. Reife Konidien werden schließlich durch den Wind vom Konidiophor getrennt und in der Umgebung verbreitet. Unter günstigen Umweltbedingungen keimen die Konidien aus und der vegetative Vermehrungszyklus beginnt von Neuem [Springer and Yanofsky, 1989].

1.4.2. Sexueller Lebenszyklus von *N. crassa*

Der sexuelle Reproduktionszyklus (Abbildung 1.4, unterer Zyklus) wird in *N. crassa* durch Stickstoffmangel und weitere Faktoren wie Licht und niedrige Temperaturen induziert [Kim and Borovich, 2006]. Der weibliche Kreuzungspartner, der entweder den Paarungstyp *matA* oder *mata* besitzen kann, bildet in mehreren Stufen Reproduktionsstrukturen. In einem ersten Schritt bildet sich aus einer seitlichen Hyphe eine aufgewickelte Struktur, das sogenannte Ascogon. Dieses wird durch mehrere Hyphen eingewickelt, die zusammen eine rundliche Struktur bilden. Diese entwickelt sich durch weiteres Wachstum und Differenzierungsprozesse im Inneren der Struktur zu einem reifen Vorfruchtkörper. Die sogenannten Protoperithezien bilden spezialisierte Hyphen aus, die als Trichogyne bezeichnet werden [Lichius et al., 2012a]. Trichogynen weisen chemotropes Wachstum zu Zellen des entgegengesetzten Paarungstyps auf. Dabei können sie sich verzweigen und mehrere hundert Mikrometer weit wachsen. Bei den Zellen des entgegengesetzten Paarungstyps kann es sich um Konidien, gekeimte Askosporen oder

vegetatives Myzel handeln [Kim and Borkovich, 2004; Lichius et al., 2012a]. Nachdem die Trichogyne mit der Zelle des entgegengesetzten Paarungstyps physikalischen Kontakt aufgebaut hat findet eine Zellfusion statt. Der Zellkern des entgegengesetzten Paarungstyps wandert die Trichogyne entlang bis in das Ascogon im Inneren des Protoperitheziums. Äußerlich durchgeht das Protoperithezium nun weitere Differenzierung, die unter anderem Wachstum und eine fortschreitende Melanisierung beinhalten. Im Inneren des Protoperitheziums teilen sich die Kerne entgegengesetzten Paarungstyps mehrere Male synchron. Anschließend wandern sie paarweise in eine sich entwickelnde hakenförmige Struktur, den sogenannten *Crozier*. Dort durchlaufen sie erneut eine synchrone Mitose. Durch Septierung des *Croziers* entstehen drei Zellen, von denen die mittlere zwei Zellkerne aufweist. Die andern beiden Zellen fusionieren miteinander. Erst jetzt findet die Karyogamie in dem sich entwickelnden Ascus statt. Der Karyogamie folgt sofort eine Meiose und eine anschließende mitotische Teilung, so dass ein Ascus mit 8 haploiden Askosporen entsteht. Bereits während der frühen Bildung des Ascus entsteht ein neuer *Crozier*, in den paarweise zwei Zellkerne entgegengesetzten Paarungstyps wandern und der sich zu einem reifen Ascus entwickelt. Auf diese Weise werden nacheinander mehr als 200 Asci gebildet, deren Askosporen durch ein Loch in dem reifen Perithezium, der sogenannten Ostiole, entlassen werden [Raju, 1980; Borkovich et al., 2004; Lichius et al., 2012a].

Die reifen Askosporen sind wenig anfällig gegenüber äußeren Stressfaktoren und überdauern Phasen von Trockenheit und Nährstoffmangel. Nach Hitzeeinwirkung, wie sie in der Natur etwa durch Brände vorkommen kann, keimen die Askosporen aus und treten in den vegetativen Lebenszyklus ein. Die Entdeckung, dass Askosporen durch Hitze aktiviert werden und das schnelle Wachstum von *N. crassa* erklären das wiederholte Auftreten des Pilzes in Bäckereien und die beobachtete Erstbesiedlung von verbranntem Holz [Shear and Dodge, 1927].

1.4.3. Molekulare Grundlagen der Zellfusion in *N. crassa*

Die Keimlingsfusion in *N. crassa* ist eines der bestuntersuchten vegetativen Fusionsereignisse in filamentösen Pilzen. Bis zum Jahr 2014 wurden 67 Proteine identifiziert, die eine Rolle bei der Zellfusion spielen [Lichius and Lord, 2014]. Sie sind in so vielfältigen Funktionen beteiligt wie der Regulation von Polarität, der Generierung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), der

Weiterleitung von Calcium-Signalen oder stellen Komponenten des sogenannten STRIPAK-Komplexes dar, der auch im Menschen konserviert ist [Lichius, 2010; Palma-Guerrero et al., 2013; Dettmann et al., 2013; Herzog et al., 2015]. Das Kernstück der intrazellulären Signalweiterleitung ist eine MAP-Kinasen-Kaskade, die homolog zu der Fus3 MAP-Kinasen-Kaskade des *Yeast Mating Pheromone*-Pathways aus *S. cerevisiae* ist [Pandey et al., 2004; Maerz et al., 2008; Fleissner et al., 2009]. Obwohl in der vegetativen Zellfusion von *N. crassa* und dem *Mating* in der Hefe konservierte Proteine eine Rolle spielen, besteht zwischen diesen beiden Systemen ein wichtiger Unterschied: In *N. crassa* handelt es sich bei der Keimlingsfusion um *self fusion* zwischen genetisch identischen Keimlingen, während bei dem *Yeast Mating* zwischen Zellen unterschiedlichen Paarungstyps *non-self fusion* stattfindet [Aguilar et al., 2013]. Diese Situation macht die Forschung der Zellfusion in *N. crassa* besonders attraktiv. Einerseits weist das System Ähnlichkeiten zu der gut untersuchten Zellfusion in der Hefe auf, was es ermöglicht Komponenten einfacher zu identifizieren und erste Hinweise auf mögliche Funktionen der beteiligten Komponenten zu erhalten. Auf der anderen Seite gibt es viele Unterschiede zwischen den beiden Fusionssystemen, die Spielraum für neue Erkenntnisse lassen. So sind beispielsweise viele *Upstream*-Faktoren der MAP-Kinasen-Kaskade, so wie die Pheromone, die G-Proteingekoppelten Rezeptoren und das trimere G-Protein nicht bei der vegetativen Zellfusion von *N. crassa* beteiligt [Fleissner et al., 2008; Lichius and Lord, 2014]. Darüber hinaus zeichnet sich die Zellfusion in *N. crassa* durch völlig neue Komponenten und einen ungewöhnlichen Mechanismus der Zellkommunikation aus [Fleissner et al., 2009; Lichius and Lord, 2014].

Während der Keimlingsfusion in *N. crassa* und anderen filamentösen Pilzen wachsen zwei Interaktionspartner gerichtet aufeinander zu, wobei beide Zellen ihre Wachstumsrichtung gezielt anpassen. Diese Beobachtung führte schon früh zu der Vermutung, dass es sich um chemotropes Wachstum handelt, also Wachstum in die Richtung der höchsten Konzentration eines Lockstoffs [Ward, 1888; Koehler., 1930]. Die Tatsache, dass beide Zellen ihre Wachstumsrichtung gezielt ändern deutet auf ein bidirektionales System hin, in dem beide Zellen ein chemotropes Signal sowohl senden, als auch empfangen. Diese auch als Chemoattraktant bezeichnete Substanz ist bis heute unbekannt und ihre Identifizierung ist ein wichtiges Ziel der aktuellen Fusionsforschung [Herzog et al., 2015; Fleissner and Serrano, 2016]. Da die interagierenden Keimlinge genetisch identisch sind und sich in einem vergleichbaren Entwicklungsstadium be-

finden, wird davon ausgegangen, dass sie auch denselben Chemoattraktant senden und empfangen. Dies führt unweigerlich zu der Frage, wie die Zellen während der Kommunikation eine Selbststimulation vermeiden [Fleissner et al., 2009; Read et al., 2012].

Das in filamentösen Pilzen konservierte Protein SO und die MAP-Kinase MAK-2 sind essentiell für die Zellfusion in *N. crassa*

Genetische Analysen führten zur Identifikation von zahlreichen Genen, die bei der vegetativen Zellfusion von *N. crassa* eine Rolle spielen [Lichius and Lord, 2014]. Eins dieser Gene kodiert für die MAP Kinase MAK-2, die homolog zu Fus3 aus der Hefe *S. cerevisiae* ist. Die Deletionsmutanten weisen einen pleiotropen Phänotyp auf, der unter anderem durch reduziertes Wachstum, verkürzte Lufthyphen, ein verändertes Sporulationsmuster, Askospor-Lethalität und das Fehlen von Protoperithezien gekennzeichnet ist. Von zentraler Bedeutung für die Fusionsforschung ist die Entdeckung, dass Keimlinge und Hyphen der $\Delta mak-2$ -Mutante keine chemotropen Interaktionen miteinander eingehen. Im Gegensatz zum Wildtyp ändern Keimlinge und Hyphen der Deletionsmutante ihre Wachstumsrichtung nicht, wenn sie in räumliche Nähe zueinander gelangen und fusionieren auch nach einer zufälligen Berührung nicht miteinander. In einem biochemischen Ansatz wurde eine zunehmende Phosphorylierung von MAK-2, die als Maßstab für die Aktivierung der Kinase gilt, mit den morphologischen Ereignissen der Keimschlauchverlängerung, Keimlingsfusion und der frühen Koloniebildung von *N. crassa* in Verbindung gebracht [Pandey et al., 2004].

Ein weiteres, für die vegetative Zellfusion von *N. crassa* essentielles Gen ist *soft* (*so*). Das *so*-Gen ist in filamentösen Ascomyceten konserviert, aber in einzelligen Hefen wie *S. cerevisiae* nicht vorhanden. Die *so*-Deletionsmutante in *N. crassa* weist einen pleiotropen Phänotyp auf, der sich durch verkürzte Lufthyphen, ein verändertes Sporulationsmuster, weibliche Sterilität und das Fehlen vegetativer Zellfusionen auszeichnet. Interessanterweise bildet die *so*-Deletionsmutante reife Protoperithezien, deren Trichogynen mit einem Partner des entgegengesetzten Paarungstyps interagieren und fusionieren. Die weitere Entwicklung des fertilisierten Protoperitheziums wird erst zu einem späteren Zeitpunkt blockiert, sodass sich keine reifen Perithezien oder Askosporen bilden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das

Genprodukt SO eine Rolle bei der vegetativen Zellfusion spielt, während es für die sexuelle Zellfusion entbehrlich ist und weist damit auf die unterschiedliche genetische Regulierung dieser beiden Prozesse hin [Fleissner et al., 2005]. Neuere Untersuchungen haben PRO40, ein zu SO homologes Protein aus dem eng mit *N. crassa* verwandtem filamentösen Pilz *Sordaria macrospora*, als Gerüstprotein für Komponenten der MAP-Kinasen-Kaskade des *Cell Wall Integrity*-Signalwegs identifiziert, die ebenfalls eine Rolle bei der vegetativen Zellfusion spielen [Teichert et al., 2014]. Es wird vermutet, dass SO in *N. crassa* ebenfalls als Gerüstprotein für die Kinasen des *Cell Wall Integrity*-Signalwegs fungiert und darüber hinaus unabhängige Funktionen während der Zellkommunikation übernimmt, die für diesen Prozess essentiell sind [Herzog et al., 2015; Weichert et al., 2016].

Das Modell des „Zelldialogs“

Live-Cell-Imaging-Analysen von fluoreszenzmarkierten SO- und MAK-2-Proteinen zeigten eine höchst ungewöhnliche, subzelluläre Dynamik in interagierenden Keimlingen. Während MAK-2-GFP in isolierten Keimlingen cytoplasmatisch und im Zellkern vorliegt, lokalisiert die Kinase während der Zellkommunikation und der Phase des gerichteten Wachstums außerdem abwechselnd an den Spitzen der Interaktionspartner. Wenn MAK-2 also zu einem gegebenen Zeitpunkt an der Spitze eines Keimlings lokalisiert, dann ist das Fusionsprotein zum gleichen Zeitpunkt an der Spitze der Partnerzelle abwesend und stattdessen im Cytoplasma und in den Zellkernen zu sehen. Nach 3 bis 6 Minuten ist die Situation genau umgekehrt: nun lokalisiert MAK-2-GFP in dem ersten Keimling cytoplasmatisch und im Zellkern, während es zum selben Zeitpunkt an der Spitze der Partnerzelle akkumuliert (Abbildung 1.5A). Diese Dynamik wird als *Switching* bezeichnet und wiederholt sich mehrere Male, bis die beiden Interaktionspartner sich berühren und ihr Wachstum einstellen. Daraufhin akkumuliert MAK-2 an der Kontaktstelle zwischen den Keimlingen. Die mikroskopischen Analysen von SO-GFP zeigten eine vergleichbare dynamische Lokalisation an den Spitzen interagierender Keimlinge wie MAK-2 (Abbildung 1.5B). Ein Unterschied in der Lokalisation beider Proteine liegt darin, dass SO im Gegensatz zu MAK-2 aus den Zellkernen ausgeschlossen ist [Fleissner et al., 2009].

Um herauszufinden, ob MAK-2 und SO gleichzeitig oder zeitlich versetzt an den Spitzen von interagierenden Keimlingen akkumulieren, wurde die Fähigkeit von *N. crassa* zur vegetativen Zellfusion ausgenutzt. Werden *mak-2-gfp*-exprimierende Sporen mit Sporen gemischt, die *so-dsRed* exprimieren, entsteht durch Zellfusion ein heterokaryotisches Myzel, in dem beide Fluoreszenzkonstrukte exprimiert werden. Die Lokalisation von MAK-2-GFP und dsRED-SO wurde in solchen heterokaryotischen Keimlingen untersucht, während sie gerichtet aufeinander zuwachsen. Dabei wurde beobachtet, dass SO und MAK-2 exakt entgegengesetzt an den Spitzen der Interaktionspartner lokalisieren. Wenn MAK-2-GFP sich an der Spitze des ersten Keimlings befindet, lokalisiert dsRED-SO zum gleichen Zeitpunkt an der Spitze des Interaktionspartners. Nach etwa 3 bis 6 Minuten akkumuliert MAK-2-GFP an der Spitze des Fusionspartners, an der zuvor SO lokalisierte. An dieser Zellspitze ist das dsRED-SO-Signal verschwunden und akkumuliert nun an der Spitze des ersten Keimlings, an der wenige Minuten zuvor MAK-2 beobachtet wurde (Abbildung 1.5C). Dieses *Switching* wiederholt sich mehrere Male, bis SO und MAK-2 am Berührungspunkt akkumulieren. Diese hochdynamische und über die räumliche Distanz zwischen den interagierenden Keimlingen genau aufeinander abgestimmte subzelluläre Lokalisation führte zu der Entwicklung des „Zelldialog“-Modells. Dieses Modell beruht auf der Annahme, dass beide interagierenden Zellen schnell zwischen zwei physiologischen Zuständen wechseln, die mit dem Senden und dem Empfangen eines unbekannten Signals assoziiert sind. Die beiden unterschiedlichen Zustände definieren sich jeweils durch die Anwesenheit oder die Abwesenheit von MAK-2 an der Spitze des jeweiligen Keimlings. Dabei wurde die Anwesenheit von MAK-2 mit dem Empfangen und die Abwesenheit von MAK-2 (und gleichzeitige Anwesenheit von SO) mit dem Senden eines chemotropen Signals in Verbindung gebracht [Fleissner et al., 2009]. Mathematische Modellierungen des „Zelldialog“-Modells zeigen, dass dieser Mechanismus es den interagierenden Zellen ermöglicht denselben Chemoattractanten zu senden und zu empfangen und gleichzeitig eine Selbststimulation zu vermeiden [Goryachev et al., 2012].

Auf Grund der konservierten Funktionen von MAP Kinasen in Eukaryoten, die bei der intrazellulären Weiterleitung von extrazellulären Signalen beteiligt sind, wird für MAK-2 aus *N. crassa* eine ähnliche Funktion vermutet. Die Assoziation von MAK-2 an den Spitzen interagierender Keimlinge wird daher im „Zelldialog“-Modell mit dem Empfangen eines Signals, also dem

„Zuhören“ in Verbindung gebracht [Fleissner et al., 2009; Herzog et al., 2015]. In der Hefe *S. cerevisiae* wird Fus3 durch die *Upstream*-Kinasen des MAP-Kinasen-Moduls - bestehend aus der MAPKK Ste7 und der MAPKKK Ste11 - aktiviert und wandert anschließend in den Zellkern, wo es den Transkriptionsfaktor Ste12 aktiviert [Bardwell, 2005]. Die Kinasen des MAP-Kinasen-Moduls sind in *N. crassa* konserviert [Borkovich et al., 2004; Maerz et al., 2008]. Mutanten, die eine Deletion des für die MAPKK kodierenden Gens *mek-2* oder des für die MAPKKK kodierenden Gens *nrc-1* tragen, zeigen einen pleiotropen Phänotyp, der vergleichbar mit dem Phänotyp der *mak-2*-Deletionsmutante ist. Von besonderer Bedeutung für die Fusionsforschung ist die Beobachtung, dass Keimlinge und vegetative Hyphen aller drei Deletionsmutanten keine Interaktionen miteinander eingehen und auch nach zufälligen Berührungen nicht fusionieren [Pandey et al., 2004; Maerz et al., 2008]. Analog zu den Kinasen aus der Hefe, wird in *N. crassa* vermutet, dass NRC-1 die MAPKK MEK-2 durch Phosphorylierung aktiviert und diese im aktivierten Zustand MAK-2 phosphoryliert und somit aktiviert. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass NRC-1 notwendig für eine Phosphorylierung von MAK-2 ist [Pandey et al., 2004].

Versuche mit einer inhibierbaren Variante der MAK-2-Kinase haben gezeigt, dass die Aktivität von MAK-2 notwendig für die chemotropen Interaktionen zwischen Keimlingen und für die dynamische Lokalisation von SO und MAK-2 ist. Durch den Austausch einer spezifischen Aminosäure in der ATP-Bindetasche von MAK-2 lässt sich die Kinase-Aktivität durch das ATP-Analog 1NM-PP1 inhibieren, während die entsprechende Kinasevariante MAK-2^{Q100G} in Abwesenheit des Inhibitors keine funktionellen Einschränkungen aufweist. Aus technischen Gründen wurden die Versuche mit der inhibierbaren Kinasevariante in Keimlingspaaren durchgeführt, in denen ein Interaktionspartner das *mak-2*^{Q100G}-Allel exprimiert und der andere Partner *mak-2-gfp*. Die Inhibition der MAK-2^{Q100G}-Kinase-Aktivität in interagierenden Keimlingen führte zu einem Abbruch der Zell-Zell-Kommunikation und in der Partnerzelle zu einer Entlassung von MAK-2-GFP ins Cytoplasma. In Keimlingen, die *mak-2*^{Q100G} und *so-gfp* im Δ *mak-2*-Hintergrund exprimieren, wurde die oszillierende Dynamik von SO-GFP in interagierenden Keimlingen durch Inhibition der Kinase-Aktivität unterbrochen. Nach Abbruch der Zell-Zell-Kommunikation akkumulierte SO-GFP in Punkten über die gesamte Membran beider Interaktionspartner verteilt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die subzelluläre Dynamik von SO und

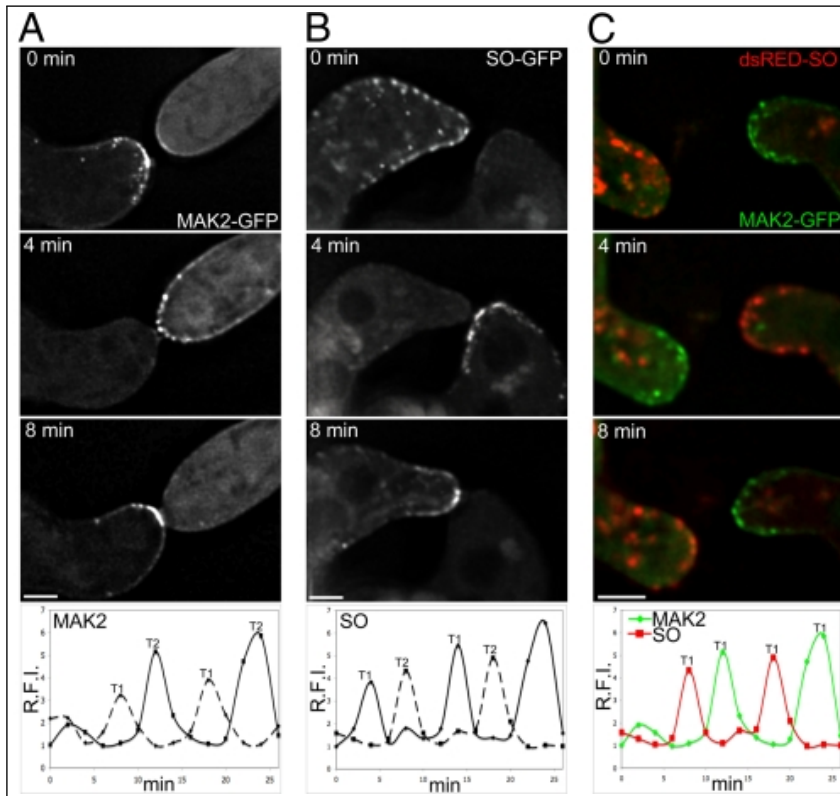


Abbildung 1.5.: Oszillierende Lokalisierung von SO und MAK-2 an den Spitzen interagierender Keimlinge

A) In einer Zeitreihe oszilliert MAK-2-GFP an den Spitzen interagierender Keimlinge. Die Graphik repräsentiert die Lokalisation von MAK-2-GFP an den Spitzen von zwei interagierenden Keimlingen mit T1: Spitze von Keimling1 und T2: Spitze von Keimling2. Die Y-Achse gibt die relative Fluoreszenz-Intensität (R.F.I.) im Bereich der Zellspitze im Vergleich zum Hintergrund-Signal an. Die Zeit ist auf der X-Achse dargestellt. B) SO-GFP lokalisiert in einer Zeitreihe abwechselnd an den Spitzen interagierender Keimlinge. Die Graphik repräsentiert die Fluoreszenzintensitäten von SO-GFP an den Spitzen der Interaktionspartner. Beschriftung analog zu (A). C) Zeitreihe der versetzt oszillierenden Lokalisation der Fluoreszenzproteine MAK-2-GFP und dsRED-SO an den Spitzen interagierender Keimlinge. Der Graph zeigt die alternierende Oszillation von MAK-2-GFP und dsRED-SO in einem Keimling. Es ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität von MAK-2-GFP am niedrigsten ist, wenn die Intensität von dsRED-SO in demselben Keimling am höchsten ist, und andersrum. Die Beschriftung der Graphik ist identisch zu (A). Maßstab: 2 μ m. Abbildung entnommen aus [Fleissner et al., 2009].

MAK-2 abhängig von der MAK-2-Kinase-Aktivität ist und innerhalb eines Keimlings, aber auch über eine räumliche Distanz zwischen zwei interagierenden Keimlingen hoch koordiniert stattfindet [Fleissner et al., 2009].

In der Hefe *S. cerevisiae* wandert die aktivierte Kinase Fus3 in den Zellkern und phosphoryliert den Transkriptionsfaktor Ste12, der die Transkription von *Mating*-spezifischen Genen reguliert [Bardwell, 2005]. Ein zu Ste12 homologer Transkriptionsfaktor wurde in *N. crassa* identifiziert und die entsprechende Deletionsmutante *pp-1* weist einen zu der *mak-2*-Deletionsmutante vergleichbaren Phänotyp auf, inklusive das Fehlen vegetativer Zellfusionen [Li et al., 2005]. Durch vergleichende Genexpressionsanalysen von Keimlingen einer *pp-1*-Deletionsmutante und dem Wildtyp wurden bekannte und neue Faktoren entdeckt, die eine Rolle bei der vegetativen Zellfusion spielen. Im Zuge dieser Experimente wurde auch die Genexpression in Keimlingen, die das Allel für die inhibierbare Kinasevariante *mak-2*^{Q100G} exprimieren, mit und ohne Zugabe des Inhibitors verglichen. Die Expression von *mak-2* ist in Keimlingen, in denen die Aktivität von MAK-2^{Q100G} durch Zugabe des Inhibitors blockiert ist, im Vergleich zu den Keimlingen ohne Inhibitor-Zugabe reduziert. Diese Daten deuten auf einen positiven Rückkopplungsmechanismus hin, in dem aktiviertes MAK-2 die Expression des *mak-2*-Gens fördert [Leeder et al., 2013; Weichert and Fleißner, 2015]. Positive Feedback-Loops, die zu einer Verstärkung des Signals führen, werden als Voraussetzung für die Vermeidung der Selbststimulation im Modell des „Zelldialogs“ angesehen [Read et al., 2012].

1.5. Ziel der Arbeit

Die Beobachtung der ungewöhnlichen subzellulären Lokalisation von MAK-2 in interagierenden Keimlingen hat entscheidende Beiträge zu unserem Verständnis der molekularen Mechanismen der Zellfusion in *N. crassa* beigetragen. Im Gegensatz zu der MAP-Kinase MAK-2 ist über die *Upstream*-Kinasen MEK-2 und NRC-1 in *N. crassa* bisher wenig bekannt. Um die Kinasen zu beschreiben und mehr über ihre Funktion während der Kommunikation zwischen Keimlingen zu lernen, sollten in einem ersten Teil dieser Arbeit *Live Cell Imaging*-Experimente durchgeführt werden um die Lokalisation von MEK-2 und NRC-1 in reifen Hyphen und interagierenden Keimlingen zu bestimmen. Anhand von Co-Lokalisierungs-Experimenten der drei

Kinasen sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, in welchen subzellulären Kompartimenten die Kinasen sich treffen und möglicherweise aktivieren, und ob sie gemeinsam Komplexe bilden, bei deren Zusammenhalt analog zu *S. cerevisiae* Gerüstproteine beteiligt sein könnten.

Die exakte Koordination zwischen SO und MAK-2 während des „Zelldialogs“ deutet auf eine wichtige regulatorische Funktion der subzellulären Dynamik für die Funktion der MAP-Kinase hin. Um zu testen, ob die subzelluläre Beweglichkeit essentiell für die Funktion von MAK-2 ist, wurde in vorangegangenen Untersuchungen die Dynamik durch eine artifizielle und permanente Membranrekrutierung der Kinase über einen Farnesylanker komplett unterbrochen. Die membranverankerte Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX weist neben der für die Membranassoziation notwendigen CAAX-Sequenz noch GFP auf, damit die Membranverankerung mikroskopisch visualisiert werden kann. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von membrangebundenem MAK-2-GFP-CAAX erwiesen sich, vermutlich aufgrund einer schnellen Degradation des Fusionsproteins, besonders in Keimlingen als schwierig [Lemanski, 2010]. In einem zweiten Teil dieser Arbeit sollte daher an diesen Arbeiten angeknüpft werden, um die Zusammenhänge zwischen der Lokalisation, der Funktion und der Aktivität von MAK-2 und der *Upstream*-Kinase MEK-2 besser zu verstehen.

Um weitere Versuche mit permanent membranlokalisierten Kinasen erfolgreich durchführen zu können, sollte daher in dieser Arbeit zunächst die Expression von *mak-2-gfp-caax*-Fusionskonstrukten in *N. crassa* optimiert werden. Anschließend sollten verschiedene Test- und Kontrollstämme hergestellt werden, in denen die Kinasen MAK-2 und MEK-2 permanent an die Plasmamembran dirigiert werden, oder ihre freie Beweglichkeit erhalten bleibt. Um den Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Funktion der beiden Kinasen zu untersuchen, sollten die erhaltenen Stämme makroskopisch charakterisiert und mikroskopisch durch *Live Cell Imaging* untersucht werden. Um den Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Aktivität der Kinasen besser zu verstehen, sollte eine mögliche Aktivierung der membrangebundenen Kinasen in Western-Blots untersucht werden. Der Vergleich zwischen vegetativen und sexuellen Fusionsereignissen in *N. crassa* zeigt einige Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede in der Regulation dieser Ereignisse. Das MAK-2 MAP-Kinasen-Modul ist für beide Prozesse essentiell [Maerz et al., 2008]. Um zu untersuchen, welche Rolle die subzelluläre

1. Einleitung

Dynamik von MEK-2 für die sexuelle Zellfusion spielt, sollten in dieser Arbeit Kreuzungen mit *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden-Stämmen durchgeführt und die Entwicklung der weiblichen Reproduktionsstrukturen und der Askosporen beobachtet werden.

Insgesamt sollten in dieser Arbeit die Zusammenhänge zwischen der ungewöhnlichen subzellulären Dynamik, der Funktion und der Aktivität von MAK-2 und den aktivierenden Kinasen MEK-2 und NRC-1 untersucht werden. Hierdurch sollten neue Erkenntnisse über die räumliche Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade und den Mechanismus der intrazellulären Signalweiterleitung in interagierenden Keimlingen in *N. crassa* gewonnen werden, die das bisherige Modell des "Zelldialogs" unterstützen und erweitern.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Verwendete *N. crassa*-Stämme

Tabelle 2.1.: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten *N. crassa*-Stämme

Stamm	Genotyp	Beschreibung	Herkunft
314	<i>his-3⁺::pccg-1-nrc-1-gfp</i>	UB82 in N2-42	Diese Arbeit
435	<i>his-3⁻, trp-1⁻</i>	-	[Maerz et al., 2009]
436	<i>his-3⁻, nic-3⁻</i>	-	[Maerz et al., 2009]
599	Δ <i>mak-2::hph, mata</i>	-	FGSC11482
GN8-41	<i>his-3⁺::pccg-1-H1-dsRed, rid-1, mata</i>	CR73-1	[Rasmussen et al., 2008]
mak6.2.1	Δ <i>mak-2::hph, his-3⁻, al, mata^{DIP?}</i>	AF-M621	[Fleissner et al., 2009]
MT-12-89	<i>his-3⁺::pccg-1-mak-2-gfp-caax</i>	-	[Lemanski, 2010]
MT-15-122	<i>his-3⁺::pgpd-1-mak-2-gfp-caax</i>	p17 in N1-03	Diese Arbeit
MT-15-659	<i>his-3⁺::pgpd-1-mak-2-gfp-caax</i>	Nachkomme MT-15-122 x N1-02	Diese Arbeit
MT-17-180	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-caax</i>	p22 in N1-03	Diese Arbeit
MT-17-353	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-caax</i>	Nachkomme MT-17-180 x N1-04	Diese Arbeit
MT-19-187	<i>his-3⁺::ptef-1-mak2-gfp-caax</i>	p26 in N1-03	Diese Arbeit
MT-19-192	<i>his-3⁺::ptef-1-mak2-gfp-caax</i>	Einzelsporisolat von MT-19-187	Diese Arbeit
MT-19-378	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-gfp-caax</i>	Nachkomme MT-19-187 x N1-04	Diese Arbeit
MT-21-643	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-caax, Δ<i>mak-2::hph, alb</i></i>	p21 in mak6.2.1	Diese Arbeit
MT-22-640	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-gfp-caax, Δ<i>mak-2::hph, alb</i></i>	p27 in mak6.2.1	Diese Arbeit
MT-27-303	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-saax</i>	p64 in N1-03	Diese Arbeit
MT-27-304	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-saax</i>	p65 in N1-03	Diese Arbeit
MT-27-358	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-saax</i>	Nachkomme MT-27-304 x N1-04	Diese Arbeit

Tabelle 2.1.: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten *N. crassa*-Stämme (Fortsetzung)

Stamm	Genotyp	Beschreibung	Herkunft
MT-27-371	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-saax, mata</i>	Nachkomme MT-27-303 x N1-04	Diese Arbeit
MT-29-249	<i>his-3⁺::pmek-2-mek-2-gfp-caax</i>	p47 in N1-03	Diese Arbeit
MT-33-296	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-cherry</i>	p62 in N1-03	Diese Arbeit
MT-34-325	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-cherry</i>	p73 in N1-03	Diese Arbeit
MT-35-330	<i>his-3⁺::ptef-1-mek-2-gfp-caax</i>	p49 in N1-03	Diese Arbeit
MT-36-300	<i>his-3⁺::pste-7-ste-7-gfp, matA</i>	p39 in N1-03	Diese Arbeit
MT-37-326	<i>his-3⁺::ptef-ste-7-gfp, matA</i>	p52 in N1-03	Diese Arbeit
MT-37-327	<i>his-3⁺::ptef-ste-7-gfp, matA</i>	p53 in N1-03	Diese Arbeit
MT-37-408	<i>his-3⁺::ptef-ste-7-gfp, matA</i>	Nachkomme MT-37-327 x N1-04	Diese Arbeit
MT-38-404	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-saax, Δmak-2::hph</i>	Nachkomme MT-27-371 x N1-37	Diese Arbeit
MT-38-647	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-saax, Δmak-2::hph</i>	p64 in mak6.2.1	Diese Arbeit
MT-38-648	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-saax, Δmak-2::hph</i>	p65 in mak6.2.1	Diese Arbeit
MT-38-653	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-saax, Δmak-2::hph</i>	Einzelsporisolat von MT-38-647	Diese Arbeit
MT-38-654	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp-saax, Δmak-2::hph</i>	Einzelsporisolat von MT-38-648	Diese Arbeit
MT-39-381	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-gfp-saax, Δmak-2::hph</i>	Nachkomme MT49-359 x N1-37	Diese Arbeit
MT-41-384	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-gfp-caax, Δmek-2::hph</i>	p25 in N2-41	Diese Arbeit
MT-42-279	<i>his-3⁺::pmek-2-mek-2-gfp-caax, Δmek-2::hph</i>	p45 in N2-41	Diese Arbeit
MT-43-286	<i>his-3⁺::ptef-1-mek-2-gfp-caax, Δmek-2::hph</i>	p48 in N2-41	Diese Arbeit
MT-43-287	<i>his-3⁺::ptef-1-mek-2-gfp-caax, Δmek-2::hph</i>	p49 in N2-41	Diese Arbeit
MT-44-420	<i>his-3⁺::pmek-2-mek-2-gfp, Δmek-2::hph</i>	p39 in N2-41	Diese Arbeit
MT-45-423	<i>his-3⁺::ptef-1-mek-2-gfp, Δmek-2::hph</i>	p54 in N2-41	Diese Arbeit
MT-49-305	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-gfp-saax</i>	p66 in N1-03	Diese Arbeit
MT-49-307	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-gfp-saax</i>	p68 in N1-03	Diese Arbeit

Tabelle 2.1.: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten *N. crassa*-Stämme (*Fortsetzung*)

Stamm	Genotyp	Beschreibung	Herkunft
MT-49-359	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-gfp-saax</i>	Nachkomme MT-49-305 x N1-04	Diese Arbeit
MT-49-361	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-gfp-saax</i>	Nachkomme MT-49-307 x N1-04	Diese Arbeit
MT-60-635	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-gfp, Δmak-2::hph</i>	allgemeines Plasmid Nr. 76 in mak6.2.1	Diese Arbeit
MT-66-545	<i>his-3⁺::ptef-mak-2-gfp</i>	allgemeines Plasmid Nr. 76 in N1-03	[Letz, 2014]
MT-67-552	<i>his-3⁺::ptef-1-mek-2-gfp-saax</i>	p78 in N1-03	[Letz, 2014]
MT-68-553	<i>his-3⁺::pmek-2-mek-2-gfp-saax</i>	p75 in N1-03	[Letz, 2014]
MT-82-649	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp, Δmak-2::hph</i>	allgemeines Plasmid Nr. 40 in mak6.2.1	Diese Arbeit
MT-82-655	<i>his-3⁺::pmak-2-mak-2-gfp, Δmak-2::hph</i>	Einzelsporisolat von MT-82-649	Diese Arbeit
N1-01	<i>matA</i>	-	FGSC 2489
N1-02	<i>mata</i>	-	FGSC 988
N1-03	<i>his-3⁻, matA</i>	-	FGSC 6103
N1-04	<i>his-3⁻, mata</i>	-	FGSC 9716
N1-40	<i>his-3⁺::pccg-1-mak-2-gfp, matA</i>	-	Fleißner nicht publiziert
N1-47	<i>his-3⁺::pccg-1-mak-2-gfp, Δmak-2::hph</i>	-	[Fleissner et al., 2009]
N2-35	<i>Δerg-2::hph</i>	-	FGSC 17460
N2-41	<i>Δmek-2::hph, his-3⁻</i>	Isolat 2	Brandt, Lemanski nicht publiziert
N2-42	<i>Δnrc-1::hph, his-3⁻</i>	Isolat 2	Brandt, Lemanski nicht publiziert
N3-15	<i>Δmek-2::hph</i>	-	FGSC 11524
PPS-06-417	<i>his-3⁺::pnrc-1-nrc-1-gfp</i>	UB104 in N2-42	Diese Arbeit
PPS-07-402	<i>his-3⁺::ptef-nrc-1-gfp, matA</i>	UB309 in N1-03	Diese Arbeit
PPS-07-403	<i>his-3⁺::ptef-nrc-1-gfp, matA</i>	UB310 in N1-03	Diese Arbeit
PPS-07-437	<i>his-3⁺::ptef-nrc-1-gfp, matA</i>	Einzelsporisolat von PPS-07-402	Diese Arbeit
PPS-09-443	<i>his-3⁺::pccg-1-mek-2-cherry, nic-3⁻</i>	p43 in 436	Diese Arbeit
PPS-10-445	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-cherry, nic-3⁻</i>	p72 in 436	Diese Arbeit
PPS-10-446	<i>his-3⁺::ptef-1-mak-2-cherry, nic-3⁻</i>	p72 in 436	Diese Arbeit

Tabelle 2.1.: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten *N. crassa*-Stämme (*Fortsetzung*)

Stamm	Genotyp	Beschreibung	Herkunft
PPS-13-454	<i>his-3⁺::pccg-1-mek-2-gfp, trp-1⁻</i>	p36 in 435	Diese Arbeit
PPS-13-455	<i>his-3⁺::pccg-1-mek-2-gfp, trp-1⁻</i>	p36 in 435	Diese Arbeit
PPS-14-456	<i>his-3⁺::pccg-1-mak-2-gfp, trp-1⁻</i>	allgemeines Plasmid Nr. 15 in 435	Diese Arbeit
PPS-14-458	<i>his-3⁺::pccg-1-mak-2-gfp, trp-1⁻</i>	allgemeines Plasmid Nr. 15 in 435	Diese Arbeit
PPS-15-460	<i>his-3⁺::ptef-1-nrc-1-gfp, trp-1⁻</i>	UB310 in 435	Diese Arbeit
PPS-15-464	<i>his-3⁺::ptef-1-nrc-1-gfp, trp-1⁻</i>	Einzelsporisolat von PPS-15-460	Diese Arbeit

2.1.2. Plasmide

Tabelle 2.2.: Liste verwendeter Plasmide

Plasmid	Bezeichnung	Herkunft
allgemeines Plasmid Nr.15	<i>pccg-1-mak-2-gfp</i>	Fleißner
allgemeines Plasmid Nr.40	<i>pmak-2-mak-2-gfp</i>	Fleißner
allgemeines Plasmid Nr.76	<i>ptef-1-mak-2-gfp</i>	[Letz, 2014]
p17	<i>pgpd-1-mak-2-gfp-caax</i>	Diese Arbeit
p21	<i>pmak-2-mak-2-gfp-caax</i>	Diese Arbeit
p22	<i>pmak-2-mak-2-gfp-caax</i>	Diese Arbeit
p25	<i>ptef-1-mak-2-gfp-caax</i>	Diese Arbeit
p26	<i>ptef-1-mak-2-gfp-caax</i>	Diese Arbeit
p27	<i>ptef-1-mak-2-gfp-caax</i>	Diese Arbeit
p36	<i>pccg-1-mek-2-gfp</i>	Diese Arbeit
p39	<i>pmek-2-mek-2-gfp</i>	Diese Arbeit
p43	<i>pccg-1-mek-2-cherry</i>	Diese Arbeit
p45	<i>pmek-2-mek-2-gfp-caax</i>	Diese Arbeit
p47	<i>pmek-2-mek-2-gfp-caax</i>	Diese Arbeit
p48	<i>ptef-1-mek-2-gfp-caax</i>	Diese Arbeit
p49	<i>ptef-1-mek-2-gfp-caax</i>	Diese Arbeit

Tabelle 2.2.: Liste verwendeter Plasmide (*Fortsetzung*)

Plasmid	Bezeichnung	Herkunft
p52	<i>ptef-1-mek-2-gfp</i>	Diese Arbeit
p53	<i>ptef-1-mek-2-gfp</i>	Diese Arbeit
p54	<i>ptef-1-mek-2-gfp</i>	Diese Arbeit
p62	<i>pmak-2-mak-2-cherry</i>	Diese Arbeit
p64	<i>pmak-2-mak-2-gfp-saax</i>	Diese Arbeit
p65	<i>pmak-2-mak-2-gfp-saax</i>	Diese Arbeit
p66	<i>ptef-1-mak-2-gfp-saax</i>	Diese Arbeit
p68	<i>ptef-1-mak-2-gfp-saax</i>	Diese Arbeit
p72	<i>ptef-1-mak-2-cherry</i>	Diese Arbeit
p73	<i>ptef-1-mak-2-cherry</i>	Diese Arbeit
p75	<i>pmek-2-mek-2-gfp-saax</i>	Schneider
p78	<i>ptef-1-mek-2-gfp-saax</i>	Schneider
UB82	<i>pccg-1-nrc-1-gfp</i>	Brandt
UB104	<i>pnrc-1-nrc-1-gfp</i>	Brandt
UB309	<i>ptef-1-nrc-1-gfp</i>	Brandt
UB310	<i>ptef-1-nrc-1-gfp</i>	Brandt

2.1.3. Verwendete Primer

Tabelle 2.3.: Liste verwendeter Primer

Nummer	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
1	MAK-TEST-F	CCCCGAGGAGTTCTTTGATTTC
2	MAK-TEST-R	AAGGCGTTATGTTGGCGTGG
19	pMF272FOR4859	TCCCACCTCCCCAATACCATTC
20	PMF2 (Isao)	GGACACGCTGAACTTGTGGC
69	MAK-SEQ-F	AGTCGGCGAAACAACCGAACC
107	STE7-F	ATTATTATCTAGAATGGCCGACCCATTGCCC
108	STE7-R	ATTATTATGAATTCTGTTGTGAAGGGTGAATGGG
109	STE7-MF	ATTATTATGAATTCTGTTGTGAAGGGTGAATGGG

Tabelle 2.3.: Liste verwendeter Primer (*Fortsetzung*)

Nummer	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
110	STE7-MR	GGAGAGCTAGTTAACGATGTCGCCGACGACTTTGTGGG
126	STE-7SEQ	GTACCTCTACTCCAAACACC
135	Ste7 XbaI	GCTTAAACAAACATCTAGAATGGCCGACCCATTT
136	Ste7 PacI	CTCAACTTAATTAATAATCGGCCAGTTGGAGGCTGCA
137	Nrc1 BamHI	GTCGCTGGATCCATGGCCATGCTGGCATCCAAGT
138	Nrc1 PacI	AGACTCTTAATTAATGTCCCGGGCACAGGCGTCAAGA
227	MAK-GFP-F	AACCATTCCTAGAATGAGCAGCGCACAAAGAGGCGG
228	GFP-Farn-F	CAACTTTATTAATTAACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
236	STE-7-FII	ATTAATAGCGGCCGCTCCTAGTCTTCAGTTCCTTACCG
237	GFP-Ras1-Farn-R	AACCATGAATTCTCACATCATTATGCACTTGGCGCAGCAGCCTGC TTGGACGTCTCGTCACCGACGTCCATCTGCTTGTACAGCTCGT CCATGCCGAG
275	TEF mutXba F	GGTGGCGGCCGCGATATCCCGTGACCACTGAACTACACTA GTCAAGAGTGAAGCTTGTGG
276	TEF R	AATTCTAGATAACCCGGGGATCCGATATC
277	pPM F	GTGGCGGCCGCAACATGCTCCAAGAAGGGG
278	pPM R	AGAGTCTTAATTAATTGACGTGTCCCGAAAAG
279	PPM-mak-2 R	AACATGTTAATTAACCTCATAATCTCCTGGTAGATCAACTGC
301	MCHERRY-R	CTTGACAGCTCGTCCATGCCGC
361	roGFP-R	ATATCGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA
385	gfp-SAXX	AACCATGAATTCTCACATCATTATGGACTTGGCGGAGGAGCCTG CTTGGACGTCTCGTCACCGACGTCCATCTGCTTGTACAGCTC GTCCATGCCGAGA
476	9_Test-CAAX_PCR	CACATCATTATGCACTTGGCGCAGCAGCCTGCTTG
562	tef-F-ApaI	ATCATCGGGCCCCCGTGACCACTGAACTACACTAGTCAAGA GTGAAGCTTGTGG
703	tef-3' f	CAAGCTTTTCTTCCTCTTCC

2.1.4. Chemikalien und Enzyme

In dieser Arbeit wurden Chemikalien der Firmen Roth, Fluka, BD, Sigma, Serva, Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Merck und Applichem in einer hohen verfügbaren Reinheit verwendet. Die Reagenzien für genetische und biochemische Untersuchungen und die verwendeten

Enzyme stammen von den Firmen Thermo Fisher Scientific, New England Biolabs, Serva und Süd-Laborbedarf Gauting.

2.1.5. Antikörper

Tabelle 2.4.: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Name	Ursprung	Anbieter	Bezeichnung
Anti-GFP-Antikörper	Maus	Roche	11814460001
Anti-Maus-Antikörper, HRP-konjugiert	Ziege	Novex	A24512
Anti-Phospho-p44/42-Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling Technology	# 9101
Anti-Rabbit-Antikörper, HRP-konjugiert	Ziege	Cell Signaling Technology	# 7074
Anti- β -Tubulin-Antikörper	Maus	Covance	MMS-410P

2.1.6. Puffer und Lösungen

Tabelle 2.5.: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
1 x TBS-T (0,05-0,1%)	100 ml	10 x TBS
	900 ml	ddH ₂ O
	500-1000 μ l	Tween 20
5 x Laemmli-Probenpuffer	3,12 ml	1M Tris-HCl (pH 6,8)
	1 g	SDS
	5 ml	Glycerin
	1,5 ml	β -Mercaptoethanol
	2 mg	Bromphenolblau
	10 ml, im Wasserbad bei 50- 60 °C lösen	
10 x SDS-Laufpuffer für Proteingele	30 g	Tris
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen	
10 x TBS	200 mM	Tris-HCl
	1,5 M	NaCl
	in ddH ₂ O mit HCl auf pH 7,5 einstellen	

Tabelle 2.5.: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen (*Fortsetzung*)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
50 x TAE	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	0,5 M EDTA (pH8,8)
	mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen	
Blockierungslösung	5 %	BSA
	in 1 x TBS-T(0,05%) oder 1 x TBS-T(0,1%)	
Coomassie-Färbelösung	80 mg	Coomassie Brilliant Blue (G-250)
	1 L	ddH ₂ O
	→ 2-3 Stunden rühren bei RT	
	3 ml	konzentrierte Salzsäure
	im Dunkeln lagern	
DNA-Extraktionspuffer	100 ml	1M Tris · HCl (pH 7,5)
	300 ml	5M NaCl-Lösung
	20 g	CTAB
	10 ml	0,5M EDTA
	mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen	
	sterilfiltrieren	
	10 µl/ml	β-Mercaptoethanol erst kurz vor Gebrauch zufügen
DNA-Ladepuffer	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol FF
	15 %	Ficoll 400
	10 mM	EDTA
Plasmid Präparation aus <i>E. coli</i>		
Lösung I	9 g	Glukose
	250 ml	1M Tris-HCl (pH8)
	3 g	EDTA
	mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen	
Lösung II	8 g	NaOH
	10 g	SDS
	mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen	
Lösung III	600 ml	5M Kaliumacetat
	115 ml	Eisessig
	mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen	

Tabelle 2.5.: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen (*Fortsetzung*)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung		
Proteinextraktionspuffer I	50	mM	HEPES (pH7,5)
	5	mM	EDTA (pH8)
	2	mM	EGTA (pH8)
	100	mM	NaCl
	1	% (v/v)	Triton X
	10	% (v/v)	Glycerin
Proteinextraktionspuffer II (frisch ansetzen)	1	mM	Natriumorthovanadat
	10	mM	Natriumfluorid
	15	mM	p-Nitrophenylphosphat
	60	mM	β -Glycerophosphat
	1	Tablette	Kit Roche Complete Proteaseinhibitor
mit Proteinextraktionspuffer I auf 20ml auffüllen (4°C)			
<i>Stripping</i> -Lösung	57,3	g	Guanidin-HCl
	1,14	ml	Essigsäure
	10	ml	10 x TBS
mit dH ₂ O auf 100ml auffüllen			
Trockner-Lösung	50	ml	Glycerin
	100	ml	Ethanol
	350	ml	dH ₂ O
Western-Transfer-Puffer	3	g	Tris
	14,4	g	Glycin
	200	ml	Methanol
mit dH ₂ O auf 1L auffüllen			

2.1.7. Nährmedien

Tabelle 2.6.: Nährmedien für die Kultivierung von *N. crassa* und *E. coli*

Nährmedium	Zusammensetzung		
10 x FIGS	200	g	L-Sorbose
	5	g	D-Fruktose
	5	g	D-Glukose
mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen			
autoklavieren			

Tabelle 2.6.: Nährmedien für die Kultivierung von *N. crassa* und *E. coli* (Fortsetzung)

Nährmedium	Zusammensetzung	
20 x BDES	200 g	L-Sorbose
	5 g	D-Fruktose
	5 g	D-Glukose
	mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen autoklavieren	
50 x Vogel's Salze	125 g	Na ₃ Citrat · 2 H ₂ O
	250 g	KH ₂ PO ₄
	100 g	NH ₄ NO ₃
	10 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	5 g	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
	5 ml	Spurenelement-Stammlösung
	2,5 ml	Biotin-Stammlösung
	mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen 5 ml Chloroform (zur Konservierung)	
BDES-Medium	20 ml	50 x Vogel's Salze
	15 g	Agar
	mit ddH ₂ O auf 950 ml auffüllen autoklavieren	
	50 ml	20 x BDES
Biotin-Stammlösung	200 mg/ml	Hygromycin B (bei Bedarf)
	50 mg	Biotin
	0,5 L	Ethanol
	0,5 L	ddH ₂ O
Bottom Agar	sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	
	20 ml	50 x Vogel's Salze
	15 g	Agar
	mit ddH ₂ O auf 900 ml auffüllen autoklavieren	
LB-Medium	100 ml	10 x FIGS
	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	15 g	Agar (bei Bedarf)
	mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen autoklavieren	
	100 mg/L	Ampicillin (bei Bedarf)

Tabelle 2.6.: Nährmedien für die Kultivierung von *N. crassa* und *E. coli* (Fortsetzung)

Nährmedium	Zusammensetzung	
Minimalmedium	20 ml	50 x Vogel's Salze
	20 g	Saccharose
	15 g	Agar (bei Bedarf)
	mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen	
	autoklavieren	
	500 mg/L	Histidin (bei Bedarf)
	10 mg/L	Nicotinamid (bei Bedarf)
	200 mg/L	Tryptophan (bei Bedarf)
	200 mg/L	Hygromycin B (bei Bedarf)
Spurenelement-Stammlösung	50 g	Zitronensäure · H ₂ O
	50 g	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O
	10 g	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) · 6 H ₂ O
	2,5 g	CuSO ₄ · 5 H ₂ O
	0,5 g	MnSO ₄ · H ₂ O
	0,5 g	H ₃ BO ₃
	0,5 g	NaMoO ₄ · 2 H ₂ O
	mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen	
Top Agar	sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	
	20 g	Vogel's Salze
	10 g	Agar
	mit ddH ₂ O auf 900 ml auffüllen	
	autoklavieren	
	100 ml	10 x FIGS
2 x Westergaard's Lösung	2 g	KNO ₃
	1,4 g	K ₂ HPO ₄
	1 g	KH ₂ PO ₄
	1 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	0,2 g	NaCl
	0,2 g	CaCl ₂
	0,1 ml	Biotin-Stammlösung
	0,2 ml	Spurenelement-Stammlösung
	mit ddH ₂ O auf 1L auffüllen	
Westergaard's Medium	500 ml	2 x Westergaard's Lösung
	15 g	Saccharose
	15 g	Agar
	mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen	
	autoklavieren	

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Klonierungsstrategien

Die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide basieren auf dem Plasmid pMF272 (Abbildung 2.1), das in *N. crassa* ein etabliertes System für die Expression von *gfp*-Fusionskonstrukten ist [Freitag et al., 2004]. Das Plasmid enthält zwei Selektionssysteme. Das Ampicillin-Resistenzgen *β -lactamase* (*bla*) ermöglicht eine Selektion in *Escherichia coli* und das *split his-3*-Gen die gezielte Integration in das Genom von *N. crassa*. Ein für Histidin auxotropher Empfängerstamm wird durch die erfolgreiche Integration des Plasmids am *his-3*-Lokus prototroph für Histidin, so dass eine Selektion der Transformanten auf Minimalmedium stattfinden kann [Aramayo and Metzenberg, 1996]. Darüber hinaus enthält das Plasmid pMF272 das *sgfp*-Gen unter der Kontrolle des *ccg-1*-Promotors [Lorang et al., 2001; McNally and Free, 1988; Loros et al., 1989; Freitag et al., 2004]. Zwischen dem Promotor und dem *sgfp*-Gen befindet sich eine *Multiple Cloning Site* (MCS), in die gewünschte Nukleotid-Sequenzen integriert werden können. Weitere Restriktionsschnittstellen ermöglichen einen Austausch des Promotors oder des *sgfp*-Gens.

In einer vorangestellten Arbeit wurde basierend auf dem Plasmid pMF272 das Plasmid p5 (pGFP-MT-3) hergestellt, in dem die *sgfp*-Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *PacI* und *EcoRI* gegen die Sequenz *gfp-caax* ausgetauscht wurde. Die *gfp-caax*-Sequenz wurde mit Hilfe des Primers 237 (GFP-Ras1-Farn-R) amplifiziert, der 60 Nukleotide des 3'-Endes von *ras-1* aus *N. crassa* enthält und für eine sogenannte CAAX-Sequenz kodiert. Die CAAX-Sequenz wird in der Zelle posttranslational modifiziert und vermittelt eine Assoziation der Genprodukte mit der Plasmamembran [Lemanski, 2010]. Die Plasmide p5 (pGFP-MT-3) und pMF272 sind modular aufgebaut und dienten als Grundgerüst für alle in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Plasmide (Tabelle 2.2). In dieser Arbeit wurden über die Schnittstellen *XbaI* und *PacI* gewünschte DNA-Sequenzen zwischen die Promotor-Sequenz und das *gfp(-caax)*-Gen in das entsprechende Ausgangsplasmid integriert und in *N. crassa* als *gfp(-caax)*-Fusionskonstrukte exprimiert. Für die Herstellung weiterer Plasmide wurde die Promotorsequenz über die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *XbaI*, native Promotorsequenzen mit entsprechenden Genen über die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *PacI* und die *gfp(-caax)*-

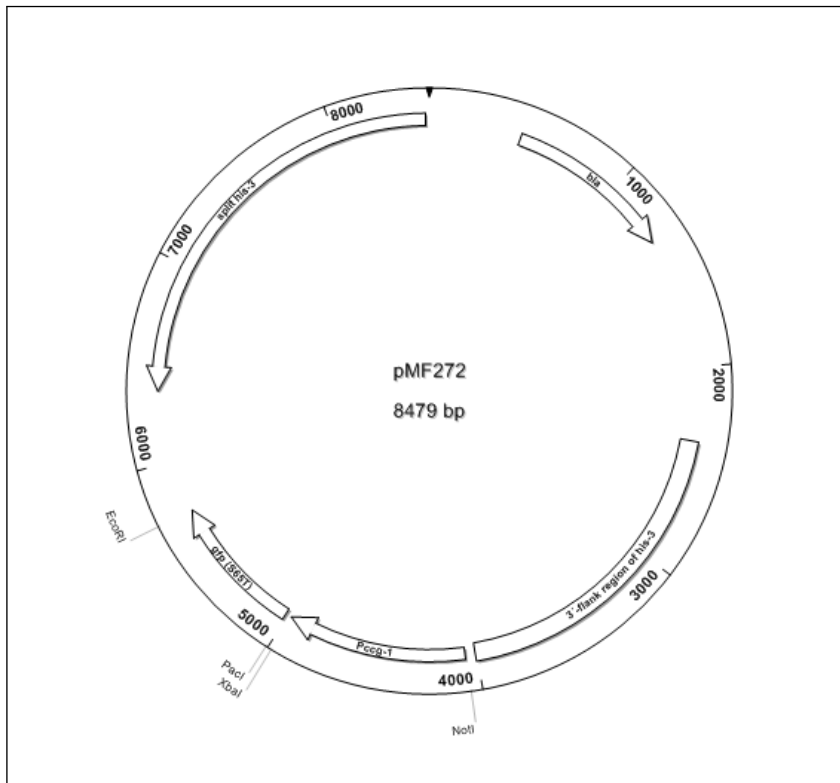


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung des Plasmid pMF272 zur homologen Integration am *his-3*-Lokus von *N. crassa*

Es sind das Ampicillin-Resistenzgen β -lactamase, das *his-3*-Integrationssystem, der *ccg-1*-Promotor, das *sgfp*-Gen und die für diese Arbeit bedeutsamen Restriktionsschnittstellen *NotI*, *XbaI*, *PaeI* und *EcoRI* dargestellt. Die Darstellung des Plasmids erfolgt mit der Software SeqBuilder (Lasergene DNASTAR).

Sequenzen über die Restriktionsschnittstellen *PaeI* und *EcoRI* ausgetauscht. Die hierzu jeweils verwendeten DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe von entsprechenden Primern (Tabelle 2.3), welche die benötigten Restriktionsschnittstellen beinhalten, aus genomischer Template DNA oder von Plasmiden amplifiziert und mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Alternativ wurden die gewünschten DNA-Sequenzen direkt aus vorhandenen Plasmiden ausgeschnitten. Anschließend wurden alle DNA-Sequenzen über eine Gelelektrophorese getrennt, aus dem Gel eluiert und in das entsprechende Ausgangsplasmid ligiert. Die erhaltenen Plasmide wurden in *E. coli* amplifiziert, aufgereinigt und anschließend in *N. crassa* transformiert. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Schritte der Klonierungsstrategien beschrieben.

2.2.2. Polymerase chain reaction, PCR

Um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren, wurden in dieser Arbeit Polymerase-Kettenreaktionen (*Polymerase chain reaction*, PCR) mit entsprechenden Oligonukleotiden durchgeführt (Tabelle 2.3). Dabei wurden je nach Fragestellung verschiedene PCR-Ansätze gewählt (Tabelle 2.7). Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die für Klonierungen gewonnen wurden oder sequenziert werden sollten, wurde die PCR mit der Phusion-DNA-Polymerase von Thermo Fisher Scientific durchgeführt, die über eine *Proofreading*-Funktion verfügt. Für diagnostische PCRs, mit denen der Genotyp von Mutanten untersucht wurde, wurden Reaktionsansätze mit der DreamTaq-DNA-Polymerase von Thermo Fisher Scientific (ehemals Fermentas) durchgeführt.

Tabelle 2.7.: Standardisierte PCR-Ansätze und Programme

Komponente	DreamTaq-Polymerase		DreamTaq-Polymerase	
ddH ₂ O	37,7	μl	32,5	μl
Puffer	5	μl	10	μl
dNTPs (10mM)	1	μl	1	μl
Forward-Primer (10mM)	2,5	μl	2,5	μl
Reverse-Primer (10mM)	2,5	μl	2,5	μl
DNA-Polymerase	0,3	μl	0,5	μl
Template-DNA	1	μl	1	μl
Gesamtvolumen	50	μl	50	μl

Schritt	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	
Vorheizen	95 °C	1 min	98 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 sec	98 °C	30 sec	} 34 x
Annealing	55-65 °C	30 sec	55-65 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min/kb	72 °C	30 sec/kb	
finale Elongation	72 °C	10 min	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	hold	4 °C	hold	

2.2.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA nach ihrer Größe erfolgte für analytische und präparative Zwecke über eine Gelelektrophorese. Je nach Größe der Fragmente wurden Lösungen von 0,8-1,5 % (w/v) Agarose in 1xTAE-Puffer hergestellt, aufgekocht und bei 60 °C temperiert. Um die DNA anzufärben wurde die Lösung mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 167 ng/ml versetzt. Anschließend wurde die Lösung in Gelträger gegossen, ein Kamm eingesetzt und bei Raumtemperatur bis zum Erstarren abgekühlt. Je nach Verwendungszweck wurden 1-50 μ l der zu untersuchenden DNA-Proben mit 1/10 Volumen Ladepuffer gemischt und in eine Geltasche pipettiert. Als Größenstandard wurden 1 μ l des GeneRuler 1 kb DNA Ladders von Thermo Fisher Scientific aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 100 bis 150 V für ca. 30 bis 60 Minuten. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert und die Größe und Menge der zu untersuchenden Fragmente anhand des Größenstandards bestimmt und ausgewertet. Die gewünschten Fragmente präparativer Gele wurden nicht fotografiert, sondern direkt aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

2.2.4. Gelextraktion von DNA

PCR- und Restriktionsansätze wurden über eine Gelelektrophorese der Größe nach getrennt und von Enzymen gereinigt. Im Anschluss wurden die Fragmente der entsprechenden Größe mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *HiYield PCR-Clean-up and gel extraction kit* der Firma SLG oder mit dem *GeneJET Gel Extraction Kit* von Thermo Fisher Scientific (ehemals Fermentas) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgte in 30-60 μ l ddH₂O.

2.2.5. Restriktionsverdau

Das Schneiden von DNA-Fragmenten an spezifischen Sequenzen durch entsprechende Restriktionsendonukleasen wurde je nach Verwendungszweck in unterschiedlichen Ansätzen

2. Material und Methoden

durchgeführt (Tabelle 2.8). Die Restriktionsverdäue wurden durchgeführt, um spezifische DNA-Fragmente aus Plasmiden zu entfernen, für die weitere Verwendung aus Plasmiden zu gewinnen, gleiche überstehende Enden für eine Ligation zu erzeugen oder um hergestellte Plasmide auf erwartete Restriktionsbanden zu testen. Dabei wurde in den Ansätzen die Menge der eingesetzten Restriktionsendonukleasen an die eingesetzte DNA-Menge angepasst und mit ddH₂O auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt. Die Ansätze wurden 3 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend auf analytischen oder präparativen Agarose-Gelen aufgetrennt und analysiert (Abschnitt 2.2.3).

Tabelle 2.8.: Standardisierte Restriktions-Ansätze

Komponente	Testverdau	präparativer Verdau
Plasmid-DNA	1 μ l	5-10 μ l
oder PCR-Produkt	-	30-60 μ l
Je Restriktionsendonuklease	0,3 μ l	1-3 μ l
Puffer	2 μ l	5-7 μ l
ddH ₂ O	x μ l	x μ l
Gesamtvolumen	20 μ l	50-70 μ l

2.2.6. Ligation

Ligationen von Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten wurden je nach Konzentration der DNA-Lösungen in verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Religationskontrolle des Plasmids durchgeführt (Tabelle 2.9). Die Ligationen erfolgten bei 16 °C über Nacht oder bei RT für 3 Stunden. Anschließend wurden die Reaktionen durch eine Inkubation bei 65 °C für 10 Minuten gestoppt und 1 μ l jedes Ansatzes in *E. coli* transformiert.

2.2.7. Transformation in *E. coli* XL1-Blue

Für die Transformation in *E. coli* wurden Aliquots mit 50 μ l kompetenten *XL1-Blue*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 μ l der Ligationsansätze bzw. der Religationskontrolle versetzt. Die Transformationsansätze wurden in Küvetten mit 2 mm Spaltbreite überführt und bei 2,5 kV, 200 Ω und

Tabelle 2.9.: Standardisierter Ligations-Ansatz

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA	1 μ l
Insert	7,5 μ l
T4-DNA-Ligase-Puffer	1 μ l
T4-DNA-Ligase	0,5 μ l
Gesamtvolumen	10 μ l

25 μ F transformiert (GenePulser II, BioRad). Direkt im Anschluss wurde der Transformations-Ansatz in ein Reagenzglas mit 2 ml flüssigen LB-Medium überführt und für 1 Stunde bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l der Zellen auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin gegeben und mit Glasperlen ausplattiert. Die restlichen Zellen wurden durch eine kurze Zentrifugation pelletiert, der Überstand verworfen, die Zellen resuspendiert und ebenfalls auf LB-Agarplatten mit Ampicillin-Zusatz ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und die am nächsten Tag erhaltenen Kolonien für die Präparation von Plasmid-DNA verwendet.

2.2.8. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Kulturröhrchen mit 2,5 ml flüssigem LB-Medium und Ampicillin-Zusatz mit transformierten Kolonien von *E. coli* angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 2 ml der Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 μ l Lösung I durch Vortexen resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 μ l der frisch angesetzten Lösung II zu dem Ansatz gegeben und durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 150 μ l Lösung III versetzt. Nach erneutem Mischen durch vorsichtiges Invertieren wurden die Ansätze für 1 min auf Eis inkubiert und im Anschluss für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Etwa 1,5 ml des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 μ l 100 %igem Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Invertieren gemischt und für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 μ l 70 %igem Ethanol durch kurzes Vortexen und ei-

ne anschließende Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch eine Zentrifugation in der Speedvac getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 30-50 μl ddH₂O mit RNaseA (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) resuspendiert. Falls nötig wurde die suspendierte DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die erhaltene DNA wurde beispielsweise in Restriktionsansätzen und als Template-DNA für PCRs verwendet. Für einige Anwendungszwecke, darunter Sequenzierung oder Transformation in *N. crassa*, wurde die aus *E. coli* isolierte DNA durch eine Phenolysierung weiter aufgereinigt. Dafür wurde die DNA-Lösung mit ddH₂O auf 200 μl aufgefüllt, mit 20 μl 3M Natriumacetat (pH 6,3) versetzt und durch kurzes Vortexen gemischt. Anschließend wurden dem Ansatz 150 μl einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) zugegeben und durch Vortexen sorgfältig gemischt. Die Ansätze wurden für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und etwa 180 μl des Überstandes vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde darauf geachtet, keine Flüssigkeit aus der unteren Phase in das neue Reaktionsgefäß zu überführen. Im Anschluss wurde die DNA durch Zugabe von 500 μl eiskaltem 100 %igem Ethanol und einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm gefällt. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 500 μl 70 %igem Ethanol, kräftigem Vortexen und 5 min Zentrifugation bei 13000 rpm gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch eine Zentrifugation in der Speedvac getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 μl ddH₂O resuspendiert. Die resuspendierte DNA wurde bei Bedarf für eine spätere Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.9. Isolierung genomischer DNA aus *N. crassa*

Für eine schnelle Isolierung von DNA aus *N. crassa* wurden Sporen des zu untersuchenden Stammes mit einem Holzstäbchen in ein 2 ml Schraubgefäß überführt, dessen Boden zuvor mit Glaskügelchen bedeckt wurde. Jedem Ansatz wurde 800 μl DNA-Extraktionspuffer zugefügt, der zuvor frisch mit 8 μl β -Mercaptoethanol versetzt wurde. Im Anschluss wurden die verschlossenen Gefäße in einem Zellaufschlussgerät 2 x für 30 sec bei 6500 m/s (maximale Intensität) geschüttelt. Die Proben wurden für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und mit 80 μl einer 3M Natriumacetat-Lösung (pH6,3) und 500 μl einer Phenol-Chloroform-Lösung (24:1) versetzt.

Die Proben wurden durch Vortexen gut gemischt und anschließend für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Etwa 400 μ l der oberen Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das 1 ml eiskalter 100 %iger Ethanol vorgelegt wurde. Der Ansatz wurde für 12 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde durch die Zugabe von 300 μ l 70 %igem Ethanol, kurzem Vortexen und 5 min Zentrifugation bei 13000 rpm gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierte DNA durch Zentrifugation in der Speedvac getrocknet und anschließend in 50 μ l TE mit RNaseA (0,2 μ g/ μ l) resuspendiert. Die Lagerung der gewonnenen DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.10. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Hierzu wurden 5 μ l der zu untersuchenden DNA-Lösung mit 995 μ l ddH₂O gemischt und in eine Quarzküvette überführt. Die Messung erfolgte im Photometer mit ddH₂O als Referenz. In der gewählten Verdünnung entspricht der gemessene Wert der zehnfachen DNA-Konzentration in μ g/ μ l. Zusätzlich wurde die zu untersuchende DNA-Lösung auf eine Agarose-Gel aufgetragen und die vorhandene Menge visuell anhand des Größenstandards GeneRuler 1kb DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific (ehemals Fermentas) abgeschätzt (Abschnitt 2.2.3).

2.2.11. DNA-Sequenzierung

Für eine Sequenzierung wurde Plasmid-DNA über eine Phenolysierung und PCR-Produkte über eine Agarose-Gelelektrophorese und dem *GeneJET Gel Extraction Kit* von Thermo Fisher Scientific (ehemals Fermentas) aufgereinigt und die Konzentration bestimmt (Abschnitt 2.2.7 und 2.2.4). Für die Sequenzierung wurden 3 μ g DNA in einem Volumen von 30 μ l eingesetzt und gemeinsam mit geeigneten Oligonukleotiden (Tabelle 2.3) an die Firma GATC Biotech versendet. In dieser Firma wurden die Sequenzierungen mit der Didesoxymethode nach Sanger [Sanger et al., 1977] durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der kommerziellen Software SeqMan von Lasergene DNASTAR und dem Server-Programm MultiAlign betrachtet und ausgewertet.

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1. Proteinextraktion aus *N. crassa*

Um Proteine aus *N. crassa* zu extrahieren, wurden 250 ml Polypropylen-Kolben mit 50 ml flüssigem Minimalmedium befüllt und mit 1 ml Sporensuspension ($1 \cdot 10^7$ Sporen/ml) der zu untersuchenden Stämme angeimpft (Abschnitt 2.4.1). Die Kulturen wurden für 20 Stunden bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Myzel über einen mit einer Lage *Miracloth* (Millipore) versehenen Büchner-Trichter geerntet, der an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen wurde. Das Myzel wurde ohne weitere Waschschrte von dem *Miracloth* gelöst, in Aluminiumfolie eingeschlagen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gefrorene Myzel wurde in der Aluminiumfolie mit einem Hammer zerkleinert und die erhaltenen Stücke in ein vorgekühltes 2 ml Schraubgefäß überführt, dessen Boden zuvor mit kleinen Glaskügelchen bedeckt wurde. Das Schraubgefäß wurde sofort auf Eis gekühlt und das Myzel mit 500 μ l eiskaltem Proteinextraktionspuffer (Proteinextraktionspuffer II frisch zubereitet und zu Proteinextraktionspuffer I zugefügt) sorgfältig gemischt. Die Proben wurden in einem Zellaufschlussgerät 3 x 30 sec bei 6500 m/s (maximale Intensität) unter ständiger Kühlung geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und alle 10 min durch Vortexen gemischt. Nach der Inkubation wurden die Proben für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit Coomassie-Brilliant-Blau photometrisch bestimmt [Bradford, 1976]. Hierzu wurden in einer Dreifachbestimmung jeweils 1 μ l der Überstände mit einer frisch verdünnten Färbelösung von RotiQuant (Roth) gemischt, für 5 min im Dunkeln inkubiert und bei einer Wellenlänge von 595 nm am UV-VIS-Photospektrometer (Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech) gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte automatisch anhand einer Regressiongeraden, die über die Absorption einer Verdünnungsreihe von BSA (0-10 μ g/ μ l) erstellt worden ist. Messungen, deren Messwerte außerhalb des linearen Bereichs der Eichkurve lagen, wurden in anderen Verdünnungen wiederholt. Die Konzentration der erhaltenen Proteinrohextrakte wurden mit Proteinextraktionspuffer auf 2,7-3,3 μ g/ μ l eingestellt, und die Proben mit 1/5 Volumen 5 x Laemmli-Probenpuffer vermischt. Die Proben wurden für 10 min bei 95 °C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.3.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte anhand ihrer molekularen Masse in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen. Für die Herstellung der Gele wurden zwei gereinigte Glasplatten durch einen *Spacer* getrennt in eine Haltevorrichtung gespannt, so dass ein 1 mm breiter Spalt entsteht, während die Platten von unten und zur Seite gut abgedichtet sind. In den Spalt wurde ca. 5 ml einer Trenngel-Mischung gefüllt (Tabelle 2.10) und diese mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das Gel bei RT stehen gelassen, bis es fertig auspolymerisiert war (ca. 30 min). Das Isopropanol wurde durch mehrmaliges Waschen mit ddH₂O entfernt. Auf das Trenngel wurden ca. 2 ml einer Sammelgel-Mischung gefüllt (Tabelle 2.10) und sofort ein Kamm von oben in den Spalt gesteckt. Das Gel wurde erneut bei RT bis zur vollständigen Polymerisierung stehen gelassen und anschließend aus der Halterung gelöst und in einer Elektrophorese-Kammer eingespannt. Diese wurde bis zur Markierung mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllt und der Kamm aus dem Gel entfernt. Die Taschen wurden mit 50 µg Proteinrohextrakt in einem Volumen von maximal 23 µl befüllt. Als Größenstandard wurden 5 µl eines Markers aufgetragen. Je nachdem, ob das Gel später mit Coomassie gefärbt oder in einem Western-Blot eingesetzt werden sollte, wurde der Marker Unstained PageRuler oder Prestained PageRuler von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Proben wurden bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt, bis die blaue Bande des Markers das untere Ende des Gels erreicht hat. Das Gel wurde aus der Elektrophorese-Apparatur entfernt, aus den Glasplatten gelöst und das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wurde entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt oder für einen Western-Blot verwendet.

Tabelle 2.10.: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele (Ansatz für 2 Gele)

Komponente	Trenngel (8 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	6 ml	3,4 ml
30 % Acrylamid-Mix	3,45 ml	830 µl
1,5M Tris (pH 8,8)	3,25 ml	-
1M Tris (pH 6,8)	-	630 µl
10 % SDS	130 µl	50 µl
10 % APS	130 µl	50 µl
TEMED	7,8 µl	5 µl
Gesamtvolumen	ca. 13 ml	ca. 5 ml

2.3.3. Coomassie-Färbung

Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel mit ca. 20 ml ddH₂O bedeckt, 30 sec in der Mikrowelle erwärmt (nicht kochen!) und für 5 min schüttelnd bei RT inkubiert. Das ddH₂O wurde abgegossen und dieser Waschschrift 2 mal wiederholt. Anschließend wurde das Gel mit ca. 20 ml der Coomassie-Färbelösung bedeckt, für 10 sec in der Mikrowelle erhitzt (nicht kochen!) und bei RT unter schütteln inkubiert, bis die gewünschte Farbintensität der Banden nach etwa 10 min erreicht wurde. Die Coomassie-Färbelösung wurde abgegossen und das Gel in ddH₂O über Nacht schütteln entfärbt, bis der gewünschte Kontrast erreicht wurde.

2.3.4. Western-Blot

Um spezifische Proteine mit Antikörpern nachzuweisen, wurden die in der SDS-PAGE getrennten Proteine zunächst durch einen Western-blot auf eine PVDF-Membran (Millipore Immobilon P, Merck) übertragen. Hierzu wurde das Gel zuerst für 15 min in Western-Transfer-Puffer äquilibriert. Währenddessen wurde eine PVDF-Membran und zwei Stück 3M Whatman-Filterpapier auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde für 15 sec in Methanol aktiviert, für 2 min in Wasser inkubiert und für mindestens 5 min in Western-Transfer-Puffer äquilibriert. Das Whatman-Papier wurde ebenfalls in Western-Transfer-Puffer getränkt. Für das Blotting wurde die „Mini Trans-Blot Cell“ (BioRad) verwendet. Für den Aufbau des Blots wurde ein in Western-Transfer-Puffer getränkter Schwamm auf die schwarze Seite der Halterung gelegt. Darauf wurden ein getränktes Whatman-Papier, das Gel, die PVDF-Membran, ein getränktes Whatman-Papier und zuletzt wieder ein in Western-Transfer-Puffer getränkter Schwamm gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten befinden. Die Halterung wurde geschlossen und in den zugehörigen Tank neben einen Kühlblock gehängt. Die Kammer wurde bis zur Markierung mit Western-Transfer-Puffer gefüllt und die Proteine bei einer Spannung von ca. 15 V (Stromstärke ca. 40 mA) über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rühren des Puffers auf die Membran transferiert. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut und die Membran mit spezifischen Antikörpern behandelt.

Immunodetektion der phosphorylierten MAP-Kinase

Um spezifisch phosphorylierte MAK-2-Varianten zu detektieren, wurde der Antikörper Anti-Phospho-p44/42 (#9101, Cell Signaling Technology) verwendet (Tabelle 2.4). Hierfür wurde die Membran mit den Proteinen zunächst für 8 Stunden bei RT oder für 16 Stunden bei 4 °C in etwa 20 ml Blockierungslösung (0,05 % Tween 20) schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran mit etwa 20 ml 1xTBST (0,05 % Tween 20) bedeckt und bei RT für 5 min schüttelnd inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und der Waschschrift 2 mal wiederholt. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C und am nächsten Tag für 1 h bei RT mit dem Anti-Phospho-p44/42-Antikörper (1:2000 in 10 ml Blockierungslösung (0,05 % Tween 20)) unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran 6 mal für 10 min bei 4 °C mit jeweils etwa 20 ml 1xTBST (0,05 % Tween 20) gewaschen und mit dem sekundären Antikörper Anti-Rabbit (#7074, Cell Signaling Technology, 1:120000 in 10 ml Blockierungslösung (0,05 % Tween 20)) für 1,5 Stunden bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Es folgten 6 weitere Waschschriffe für jeweils 10 min in etwa 20 ml 1xTBST (0,05 % Tween 20) bei 4 °C. Nun wurde die Membran in eine große Petrischale (Durchmesser 14 cm) gelegt und mit 1,4 ml Entwicklerlösung („SuperSignal West Femto Kit“, Thermo Scientific) gleichmäßig bedeckt. Die Petrischale wurde für 5 min im Dunkeln inkubiert und die durch den gebundenen sekundären Antikörper vermittelte Chemilumineszenz anschließend in einem ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad) detektiert. Anschließend wurden die Antikörper von der Membran entfernt, sodass diese für eine Immunodetektion mit anderen Antikörpern wiederverwendet werden konnte (Abschnitt 2.3.5).

Immunodetektion von GFP

Um mit GFP-fusionierte Proteine nachzuweisen, wurde der Antikörper Anti-GFP (11814460001, Roche) verwendet (Tabelle 2.4). Zunächst wurde die Membran für 1 Stunde bei RT in etwa 20 ml Blockierungslösung (0,1 % Tween 20) schüttelnd inkubiert. Dieser Blockierungsschritt entfiel, wenn die Membran zuvor dem Protokoll zum *Stripping* unterzogen wurde (Abschnitt 2.3.5). Im Anschluss wurde die Membran 3 mal für 5 min bei RT mit etwa 20 ml 1xTBST (0,1 % Tween 20) gewaschen, bevor eine Inkubation mit dem Anti-GFP-Antikörper (1:2000 in 10 ml Blockierungslösung (0,1 % Tween 20)) für 1,5 Stunden bei RT

unter ständigem Schütteln erfolgte. Der Antikörper wurde durch 4maliges Waschen für jeweils 15 min mit ca. 20 ml 1xTBST (0,1 % Tween 20) entfernt. Im Anschluss wurde die Membran mit dem sekundären Anti-Maus-Antikörper (A24512, Novex, 1:10000 in 10 ml Blockierungslösung (0,1 % Tween 20)) für 45 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde 4 mal mit etwa 20 ml 1xTBST (0,1 % Tween 20) für jeweils 5 min bei RT gewaschen und anschließend in eine Petrischale gelegt und gleichmäßig mit 1,4 ml Entwicklerlösung („SuperSignal West Pico Kit“, Thermo Scientific) bedeckt. Die Detektion und Dokumentation der Chemilumineszenz erfolgte in einem ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad). Im Anschluss wurden die Antikörper von der Membran entfernt (Abschnitt 2.3.5) und diese für weitere Experimente verwendet.

Immunodetektion von β -Tubulin

Der Nachweis von β -Tubulin gilt als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Gele mit Proteinproben und wurde mit Hilfe des Antikörpers Anti- β -Tubulin (MMS-410P, Covance) durchgeführt. Hierfür wurde die Membran unter ständigem Schütteln für 1 Stunde bei RT mit etwa 20 ml Blockierungslösung (0,1 % Tween 20) inkubiert. Dieser Schritt wurde nicht durchgeführt, wenn die Membran vorher bereits dem Protokoll für das *Stripping* unterzogen wurde. Im Anschluss wurde die Membran 3 mal für 5 min mit ca. 20 ml 1xTBST (0,1 % Tween 20) bei RT gewaschen und daraufhin für 1,5 Stunden bei RT schüttelnd mit dem Anti- β -Tubulin-Antikörper (1:2000 in 10 ml Blockierungslösung (0,1 % Tween 20)) inkubiert. Die Membran wurde 4 mal für 15 min bei RT mit etwa 20 ml 1xTBST (0,1 % Tween 20) gewaschen und anschließend für 30 min mit dem Anti-Maus-Antikörper (A24512, Novex, 1:10000 in 10 ml Blockierungslösung (0,1 % Tween 20)) schüttelnd bei RT inkubiert. Im Anschluss folgten 4 Waschschritte mit ca. 20 ml 1xTBST (0,1 % Tween 20) bei RT, bevor die Detektion der Signale analog zu dem Nachweis mit dem Anti-GFP-Antikörper erfolgte.

2.3.5. *Stripping* der PVDF-Membran

Um gebundene Antikörper-Komplexe von der Membran wieder zu entfernen, ohne die zu detektierenden Proteine abzuwaschen, wurde ein *Stripping*-Protokoll eingesetzt (nach [Yeung

and Stanley, 2009] verändert durch die Arbeitsgruppe von Dr. Tobias Kruse). Hierfür wurde die Membran nach der Detektion des Chemilumineszenz-Signals für 5 min mit etwa 20 ml 1xTBST (0,1 % Tween 20) bei RT gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 Stunde mit ca. 20 ml *Stripping*-Lösung unter ständigem Schütteln bei RT inkubiert und anschließend 3 mal für 5 min bei RT mit etwa 20 ml 1xTBST (0,1 % Tween 20) gewaschen. Abschließend wurde die Membran über Nacht mit etwa 20 ml Blockierungslösung (0,1 % Tween 20) bei 4 °C schüttelnd inkubiert und am nächsten Tag mit dem Protokoll für eine Hybridisierung mit Antikörpern nach dem Blockierungsschritt fortgesetzt.

2.4. Methoden zur Kultivierung und Analyse von *N. crassa*

2.4.1. Kultivierung und Lagerung von *N. crassa*

Um *N. crassa* vegetativ zu vermehren und zu kultivieren wurden standardmäßig mit 3 ml Minimalmedium befüllte Schrägagarröhrchen mit Konidien (z.B aus einer Dauerkultur, siehe unten) inokuliert. Für Stämme mit auxotrophen Markern wurden die entsprechenden Supplemente zuvor dem Minimalmedium beigelegt (Tabelle 2.6). Die Agarröhrchen wurden für etwa 3 Tage bei 30 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend für 2-4 Tage bei RT und einem wechselnden Tag/Nacht-Zyklus gehalten. Die gebildeten Konidien wurden mit einem Holzstäbchen entnommen und in ddH₂O resuspendiert, oder durch die Zugabe von 1-2 ml ddH₂O in die Röhrchen und kräftiges Vortexen geerntet. Die Sporen Mischung wurde durch eine mit Verbandmull (*Cheesecloth*) gestopfte blaue Pipettenspitze in ein frisches Reaktionsgefäß gefiltert. Die erhaltene Sporensuspensionen dienten unter anderem als Ausgangsmaterial um Kulturen für die Proteinextraktion und Quantifizierungen von Längenwachstum, Lufthyphen- und Sporenbildung zu inokulieren, für mikroskopische Experimente und für Einzelsporisierungen (Abschnitte 2.3.1, 2.4.7, 2.4.6 und 2.4.3). Für die Lagerung von *N. crassa* über einen längeren Zeitraum wurden die Konidien der entsprechenden Stämme als Glycerin-Stocks konserviert. Hierfür wurde 1 ml der gefilterten Sporensuspension mit 1 ml 40 % (w/v) Glycerin vermischt und bei -80 °C gelagert.

2.4.2. Transformation in *N. crassa*

Für eine Transformation von *N. crassa* wurden für Histidin auxotrophe Empfängerstämme (siehe Abschnitt 2.2.1) in 500 ml Erlenmeyerkolben inokuliert, die etwa 100 ml festes Minimalmedium mit Histidin-Zusatz enthielten. Alternativ wurden Stämme mit einer geringen Sporenproduktion in bis zu 8 Erlenmeyerkolben mit einem Volumen von 250 ml und 50 ml Minimalmedium mit Histidin inokuliert. Die Kolben wurden für 3-4 Tage bei 30 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend für 6-7 Tage bei RT und wechselndem Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Für die Transformation wurden die Sporen unter sterilen Bedingungen mit einem Spatel geerntet und in ein 50 ml Schraubgefäß gegeben, das mit etwa 45 ml eiskaltem ddH₂O gefüllt war. Die Sporen wurden durch Schütteln und Vortexen suspendiert und anschließend über einen mit Verbandmull (*Cheesecloth*) ausgelegten Trichter in ein neues vorgekühltes 50 ml Schraubgefäß filtriert. Die Sporensuspension wurde für 3 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sporen in etwa 30 ml eiskaltem Sorbitol durch Schütteln und Vortexen resuspendiert. Zwischendurch wurde die Suspension auf Eis gekühlt. Dieser Waschschrift wurde noch 2 mal wiederholt. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand gründlich abgegossen und die Sporen in einem kleinen Restvolumen resuspendiert, so dass eine zähflüssige Suspension entstand. Hiervon wurden 90 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zu 10 µl einer Plasmid-Lösung (ca. 1 µg DNA/µl) gegeben und auf Eis gehalten. In der negativen Kontrolle wurde die Sporensuspension zu 10 µl ddH₂O gegeben und anschließend exakt wie alle anderen Proben behandelt. Die Sporen/DNA-Mischung bzw. die Kontrolle wurden in Elektroporationsküvetten mit 1 mm Spaltbreite überführt und bei 1,5 kV, 600 Ω und 25 µF transformiert (GenePulser II, BioRad). Im Anschluss an die Elektroporation wurde der Transformationsansatz sofort mit 1 ml eiskaltem Sorbitol aus der Küvette gespült und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, das auf Eis gekühlt wurde. Anschließend wurden die Probe in jeweils ca. 30 ml warmen Top Agar (ca. 55 °C) gegeben, durch Schütteln gemischt und auf 6 vorgewärmte Bottom-Agar-Platten verteilt. Wenn der Agar erstarrt war, wurden die Platten bei 30 °C für 2-4 Tage im Dunkeln inkubiert. Erhaltene Transformanten, die in Kolonieform auf den Platten wuchsen, wurden unter aseptischen Bedingungen mit einer Impflanzette auf Schrägagarröhrchen mit Minimalmedium überführt und wie beschrieben inkubiert (Abschnitt 2.4.1).

2.4.3. Einzelsporisolierung

Heterokaryotische Primärtransformanten wurden bei Bedarf über eine Kreuzung (Abschnitt 2.4.4) oder eine Einzelsporisolierung aufgereinigt. Für eine Einzelsporisolierung wurden Sporen der heterokaryotischen Stämme geerntet und über Verbandmull gefiltert (Abschnitt 2.4.1). Mit Hilfe einer Impföse wurden unter aseptischen Bedingungen 1, 2 und 3 Tropfen der Sporensuspension auf 3 Platten mit BDES-Medium (bei Bedarf mit Supplementen) ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden unter einem Stereomikroskop einzelne Keimlinge identifiziert und mit einer Impflanzette auf jeweils ein frisches Röhrchen mit Minimalmedium (bei Bedarf mit Supplementen) überführt. Die Röhrchen wurden unter Standardbedingungen inkubiert und die isolierten Stämme mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 2.4.6) und/oder PCR (Abschnitt 2.2.2) untersucht. Bei Bedarf wurde die Einzelsporisolierung wiederholt.

2.4.4. Kreuzungen

Für die sexuelle Vermehrung von *N. crassa* werden zwei Kreuzungspartner mit entgegengesetztem Paarungstyp benötigt. Der als „weiblich“ bezeichnete Kreuzungspartner wurde auf einer Petrischale mit etwa 20 ml Westergaard's-Medium inokuliert. Die Kreuzungsplatten wurden bei RT und einem wechselnden Tag/Nacht-Rhythmus inkubiert. Nach 7 Tagen wurde die Bildung von Protoperithezien mit dem Stereomikroskop überprüft. Parallel zur Inkubation der Kreuzungsplatten wurde der Kreuzungspartner des entgegengesetzten Paarungstyps, der auch als „männlicher“ Kreuzungspartner bezeichnet wird, unter Standardbedingungen im Schrägagarröhrchen angezogen (Abschnitt 2.4.1). Für die Befruchtung wurden die Sporen des männlichen Kreuzungspartners mit 2 ml ddH₂O geerntet und 500-1000 µl der ungefilterten Sporensuspension mit der Pipettenspitze gleichmäßig auf der Kreuzungsplatte verteilt. Die Kreuzungsplatten wurden für weitere 21 Tage, bei Bedarf auch länger, bei RT und einem wechselnden Tag/Nacht-Rhythmus inkubiert. Die Entwicklung der sexuellen Reproduktionsstrukturen wurden regelmäßig unter dem Stereomikroskop beobachtet. Nach etwa 7 Tagen haben sich reife Perithezien gebildet, die nach etwa 14 Tagen ausreichend Askosporen entlassen haben. Diese sammeln sich in der Regel im Deckel der Kreuzungsplatte und wurden weitere 7 Tage

reifen gelassen. Im Anschluss wurden die Askosporen mit 1-2 ml ddH₂O vom Deckel der Petrischale gewaschen und in einem Reaktionsgefäß bis zum weiteren Gebrauch im Dunkeln bei RT aufbewahrt.

Um die Auswirkungen von Mutationen auf die sexuelle Entwicklung von *N. crassa* zu untersuchen, wurden die Bildung und Morphologie von Protoperithezien, Perithezien und Askosporen in regelmäßigen Zeitabständen beobachtet und dokumentiert. Um die Morphologie der Protoperithezien und Perithezien zu untersuchen, wurden die Kreuzungsplatten unter dem Stereomikroskop untersucht (Abschnitt 2.4.6). Hierfür wurden diese in der Regel ohne Deckel horizontal oder in einem 45°-Winkel auf dem Tisch des Stereomikroskops platziert. Um die Bildung und Form von Askosporen zu untersuchen wurden reife Perithezien mit einer Impflanzette aus der Kreuzungsplatte geschnitten, mit einem Tropfen Wasser auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen bedeckt und durch leichten Druck aufgebrochen. Das Deckgläschen wurde durch ein frisches ersetzt und die freigelegten Rosetten mit den Askosporen unter dem Stereomikroskop untersucht.

Um die Askosporen auszuplattieren, wurden zunächst Aliquots von 20 µl für 20 min bei 59 °C aktiviert. Im Anschluss wurden in drei Ansätzen etwa 0,5 bis 1,5 µl der Askosprensuspension (bei Bedarf auch mehr) in einen Tropfen mit 50 µl ddH₂O pipettiert, der zuvor auf je einer Platte Minimalmedium oder BDES (bei Bedarf mit Supplementen) vorgelegt wurde, und mit Glasperlen ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei RT (Minimalmedium) oder bei 30 °C (BDES) inkubiert. Am nächsten Tag wurden unter dem Stereomikroskop einzelne gekeimte Askosporen gesucht und unter aseptischen Bedingungen mit einer Impflanzette durch Ausschneiden eines kleinen Agarblocks auf frische Röhrchen mit Minimalmedium überführt und unter Standardbedingungen kultiviert (Abschnitt 2.4.1).

2.4.5. Bildung heterokaryotischer Stämme

Um heterokaryotische Stämme herzustellen, die sowohl mit GFP als auch mit dsRED/CHERRY fusionierte Proteine exprimieren, wurde die Eigenschaft von *N. crassa* ausgenutzt, miteinander zu fusionieren. Hierfür wurden gefilterte Sporensuspensionen der zu fusionierenden Stämme hergestellt (Abschnitt 2.4.1), in verschiedenen Verhältnissen miteinander gemischt (1:3, 1:2,

1:1, 2:1, 3:1) und als Inokulum für frische Schrägagarröhrchen verwendet, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Die Sporen der resultierenden heterokaryotischen Stämme wurden mikroskopisch in Bezug auf ihre grüne und rote Fluoreszenz untersucht und der Stamm mit dem ausgewogensten Verhältnis für *Live Cell Imaging*-Experimente verwendet.

2.4.6. Mikroskopische Untersuchungen

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden standardmäßig mit einem Zeiss Axiophot-2 durchgeführt. Es wurden Objektive mit einer 40- (1,30 Oil EC Plan-NEOFLUAR), einer 63- (1,40 Oil Plan-APOCHROMAT) oder einer 100-fachen Vergrößerung (1,30 Oil Plan-NEOFLUAR) verwendet. Hellfeld-Bilder wurden unter einer Differential-Interferenz-Kontrast-Optik (DIC) angefertigt. Aufnahmen wurden mit einer pco.pixelfly Kamera erstellt, die über eine modifizierte Version von 4D *microscopy software* ([Schnabel et al., 1997], angepasst durch Ralf Schnabel und Christian Henning) angesteuert wurde.

Alternativ wurde ein Zeiss Axioplan 2 *Imaging*-Mikroskop verwendet, das sich besonders für die Anfertigung von Bilderstapeln eignete. Es wurde ein Objektiv mit 100-facher Vergrößerung (1,30 Oil Pol Plan-NEOFLUAR) verwendet. Das Mikroskop war darüber hinaus mit einer pco.sensicam ausgestattet, die über die 4D *microscopy software* [Schnabel et al., 1997] angesteuert wurde.

Für Live Cell Imaging-Experimente wurde auch ein Axio *Observer* Z1 verwendet und die Proben mit einem Objektiv mit einer 100-fachen Vergrößerung (1,30 Oil Plan-NEOFLUAR) betrachtet. Das Mikroskop ist mit einer pco.edge gold-Kamera ausgestattet, die über eine angepasste 4D *microscopy software* ([Schnabel et al., 1997], angepasst durch Ralf Schnabel und Christian Henning) angesteuert wurde.

Bilderstapel wurden mit Hilfe der *Huygens Deconvolution Software* von *Scientific Volume Imaging* (SVI) deconvolviert. Die 3D-Rekonstruktionen wurden mit dem *renderer* von Huygens erstellt. Alle Fluoreszenzbilder wurden mit der Freeware ImageJ eingefärbt. Die Abbildungen wurden mit dem ImageJ Plug-in ScientiFig erstellt und beschriftet [Aigouy and Mirouse, 2013].

Für die Beobachtung von Präparaten mit dem Stereomikroskop wurde das Modell Leica M60 verwendet, das mit einer DFC295-Kamera verbunden ist. Diese wurde über die *Leica Application Suite* angesteuert, welche durch den Hersteller bereitgestellt wurde.

Sporen auf Fluoreszenz untersuchen

Um Sporen auf ihre Fluoreszenz zu untersuchen wurden die zu analysierenden Stämme unter Standardbedingungen angezogen (Abschnitt 2.4.1). Unter aseptischen Bedingungen wurden mit einem Holzstab eine kleine Menge Sporen entnommen und in einem Tropfen ddH₂O (ca. 15 µl) suspendiert, der zuvor auf einen Objektträger pipettiert wurde. Die Sporen wurden mit einem Objektträger bedeckt und die Intensität des Fluoreszenzsignals mikroskopisch untersucht.

Keimlingsassay

Um interagierende Keimlinge zu beobachten wurden die zu untersuchenden Stämme wie beschrieben kultiviert, die Sporen geerntet und die entstandene Suspension gefiltert (Abschnitt 2.4.1). Die filtrierte Sporensuspension wurde anhand ihrer Trübung verdünnt, bis sie noch leicht orange gefärbt war. Von der verdünnten Sporensuspension wurden 300 µl mit einer Pipette auf Platten mit einer dünnen Schicht (ca. 10 ml) Minimalmedium ausgestrichen. Die Platten wurden kurz getrocknet und für etwa 2 bis 2,5 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Agarblock mit einem Skalpell ausgeschnitten und je nach verwendetem Mikroskop auf einen Objektträger oder umgedreht auf ein langes Deckglas gelegt, bei Bedarf mit einem Deckgläschen bedeckt und mikroskopisch untersucht. Interagierenden Keimlinge wurden in der Regel mit einem 100x oder 63x Objektiv untersucht und in regelmäßigen Abständen oder nach Bedarf fotografiert.

Hyphenmikroskopie

Um reife, wachsende und fusionierende Hyphen zu untersuchen wurden Platten, die eine dünne Schicht (ca. 10 ml) Minimalmedium enthielten, mit Sporen oder einer Sporensuspension (Abschnitt 2.4.1) des zu untersuchenden Stammes inokuliert. Die Platten wurden über Nacht

bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einem Skalpell ein Agarblock ausgeschnitten, der die Wachstumsfront der Hyphen enthält, und mit einem Tropfen Wasser (ca. 15 µl) befeuchtet. Der Agarblock wurde auf ein Objektträger oder umgedreht auf ein langes Deckglas gegeben und mikroskopisch analysiert. Wachsende Hyphen befinden sich in der Peripherie des Myzels. Diese Hyphen ließen sich mit dem Mikroskop ins Innere der Kolonie zurückverfolgen, wo gesunde reife Hyphen beobachtet wurden. Dazwischen befinden sich die kleineren Fusionshyphen, die gerichtet aufeinander zuwachsen und fusionieren.

2.4.7. Quantifizierungen

Für alle Quantifizierungen wurden die untersuchten Stämme unter Standardbedingungen kultiviert, die Sporen geerntet und über *Cheesecloth* filtriert (Abschnitt 2.4.1). Um die Konzentration in den erhaltenen Sporensuspensionen zu ermitteln wurden in Dreifachbestimmungen Verdünnungen in ddH₂O (1:100 oder 1:10) hergestellt und die Sporen mit einem Hämozytometer gezählt. Anschließend wurde die Sporensuspension auf die gewünschte Konzentration (siehe unten) eingestellt und als Inokulum für die vorgenommenen Quantifizierungen verwendet. Alle Quantifizierungen wurden 3 bis 6 mal unabhängig voneinander wiederholt.

Längenwachstum

Die Bestimmung des Längenwachstums wurde in sogenannte *Race Tubes* vorgenommen. Hierbei handelt es sich um etwa 40 cm lange Glasröhren mit einem Durchmesser von ca. 2 cm und zwei offenen Enden. Der Boden der *Race Tubes* wurde mit Minimalmedium befüllt und dieses Erstarren lassen. Anschließend wurden die *Race Tubes* an einer Seite mit $5 \cdot 10^5$ Konidien in einem Volumen von 10 µl inokuliert und für ca. 5 Tage bei RT und einem wechselnden Tag/Nacht-Rhythmus inkubiert. Die untersuchten Stämme wachsen dabei in der Glasröhre entlang, wobei die Wachstumsfront alle 24 Stunden auf dem *Race Tube* markiert wurde. Im Anschluss wurden die Abstände zwischen den Markierungen ausgemessen und die Wachstumskurven mit den Paketen von *Microsoft Office* oder *Open Office* erstellt.

Sporenbildung

Für eine Quantifizierung der Konidien wurden Kulturröhrchen mit 2 ml Minimalmedium mit einer geraden Oberfläche vorbereitet (keine Schrägagarröhrchen) und mit jeweils $5 \cdot 10^5$ Sporen der zu untersuchenden Stämme in einem Volumen von $10 \mu\text{l}$ angeimpft. Die Röhrchen wurden für 10 Tage bei 26°C und einem wechselnden Hell/Dunkel-Zyklus inkubiert. Um die Sporen zu ernten wurden 2 ml ddH₂O in die Röhrchen gegeben, diese 6 mal für 5 sec gevortext und die entstandene Sporensuspension in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen der überführten Sporensuspensionen wurde mit der Pipette bestimmt und die Sporen dreifach in 1:100 oder 1:10 Verdünnungen mit dem Hämozytometer gezählt. Um die Konzentration der Konidien/ml zu erhalten, wurde der gezählte Wert zu dem gemessenen Volumen in Relation gesetzt.

Bildung von Lufthyphen

Um die Länge gebildeter Lufthyphen zu bestimmen wurden Kulturröhrchen, die 2 ml flüssiges Minimalmedium enthielten, mit $5 \cdot 10^5$ Sporen der zu untersuchenden Stämme in einem Volumen von $10 \mu\text{l}$ inokuliert. Die Kulturröhrchen wurden mit einem Wattestopfen verschlossen und für 4 Tage bei 26°C und einem wechselnden Hell/Dunkel-Zyklus inkubiert. Nach den ersten 24 Stunden Inkubationszeit wurde die Wachstumsfront der Lufthyphen markiert. Eine erneute Markierung der Wachstumsfront wurde nach weiteren 72 Stunden Inkubationszeit vorgenommen. Der Abstand zwischen beiden Linien wurde ausgemessen und durch 3 geteilt, um die durchschnittliche Wachstumsrate pro Tag zu ermitteln.

Keimlingsinteraktionen

Um die Keimlingsinteraktionen in den untersuchten Stämmen zu quantifizieren, wurden $5 \cdot 10^6$ Konidien in einem Volumen von $400 \mu\text{l}$ mit Glasperlen auf einer Petrischale mit einer dünnen Schicht Minimalmedium (ca. 10 ml) ausplattiert. Die Platten wurden 10 min getrocknet und anschließend bei 30°C inkubiert. Nach 4 und nach 6 Stunden Inkubationszeit wurden mit dem Skalpell etwa $1 \times 1 \text{ cm}^2$ große Stücke aus dem Agar geschnitten, auf einen Objektträger

transferiert, mit einem Tropfen Wasser (ca. 10 μ l) und einem Deckgläschen bedeckt und sofort unter dem Mikroskop zufällige Ausschnitte fotografiert. Später wurden interagierende und nicht-interagierende Keimlinge auf den Fotos mit Hilfe des ImageJ Plug-ins *Cell Counter* ausgezählt. Als interagierend wurden dabei alle Keimlinge gezählt, die ihr Wachstum deutlich in Richtung eines anderen Keimlings angepasst haben, oder sich als Resultat einer Wachstumsänderung bereits berührten. Als nicht-interagierend wurden alle Keimlinge gezählt, die ihre Wachstumsrichtung trotz der räumlichen Nähe zu anderen Keimlingen nicht an deren Richtung angepasst haben oder sich zufällig ohne eine Anpassung der Wachstumsrichtung berührten. Da Sporen der *mak-2*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp verzögert keimen [Pandey et al., 2004], wurden in allen Untersuchungen nur Keimlinge gezählt, deren Keimschlauch mindestens 3 μ m lang war, und deren Abstand maximal 10 μ m zu anderen Keimlingen betrug.

Statistische Auswertungen

Eine statistische Auswertung ausgewählter quantitativer Daten erfolgte mit Hilfe der Programmiersprache R und der integrierten Entwicklungsumgebung und grafischen Benutzeroberfläche RStudio. Um zu ermitteln, ob experimentell gewonnene Daten aus statistischer Sicht signifikant voneinander abweichen, wurden die Daten paarweise mit dem Welch-T-Test (unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz) oder dem gepaarten T-Test (abhängige Stichproben) verglichen. Der erhaltene p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die Nullhypothese (beide Mittelwerte sind gleich) abgelehnt wird, obwohl sie richtig ist. Je kleiner der p-Wert ist, desto wahrscheinlicher ist es also, dass die Mittelwerte der betrachteten Daten tatsächlich voneinander abweichen. Dabei werden die Wahrscheinlichkeiten allgemein als signifikant (* $p \leq 0,05$), hochsignifikant (* $p \leq 0,01$) oder höchstsignifikant (* $p \leq 0,001$) bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Lokalisierung der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade-Komponenten in Keimlingen

Die ungewöhnliche subzelluläre Dynamik von MAK-2 in interagierenden Keimlingen deutet auf einen engen Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Funktion der Kinase hin [Fleissner et al., 2009]. Als aktivierende Faktoren beeinflussen die vorangeschalteten Kinasen MEK-2 und NRC-1 die Aktivität und, damit zusammenhängend, auch die Funktion von MAK-2. Um weitere Hinweise auf die Funktion der Kinasen zu erhalten, sollten in dieser Arbeit alle drei MAP-Kinasen in Keimlingen während der Keimlingsinteraktion und in reifen Hyphen lokalisiert werden.

3.1.1. MAK-2-GFP zeigt eine oszillierende Dynamik in interagierenden Keimlingen

In interagierenden Keimlingen wurde eine ungewöhnliche subzelluläre Dynamik von MAK-2 beschrieben [Fleissner et al., 2009]. Für eine umfassende Untersuchung der subzellulären Lokalisation aller drei Kinasen der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade wurden diese Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit reproduziert.

In interagierenden Keimlingen des Stamme N1-47 (*pccg-1-mak-2-gfp*, Δ *mak-2*) wird MAK-2-GFP oszillierend an der Spitze der Keimlinge beobachtet. Während MAK-2-GFP zu einem bestimmten Zeitpunkt an der Spitze des einen Keimlings akkumuliert, ist an der Spitze des Interaktionspartners kein GFP-Signal zu sehen. Wenige Minuten später ist die Situation umgekehrt: MAK-2-GFP lokalisiert an der Spitze des Interaktionspartners, während das Fluoreszenzsignal an der Spitze des ersten Keimlings verschwunden ist. Dieser als *Switching* bezeichnete Prozess wiederholt sich mehrere Male, bis die Keimlinge sich berühren und MAK-2-GFP an der Berührungsstelle akkumuliert (Abbildung 3.1).

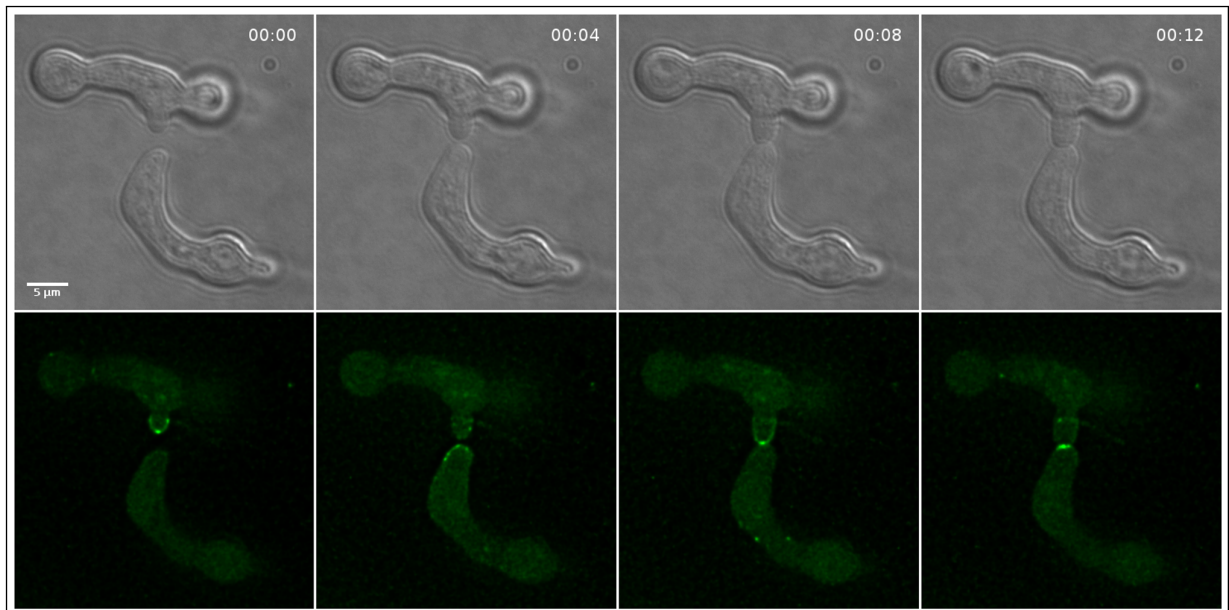


Abbildung 3.1.: Subzelluläre Dynamik von MAK-2-GFP in interagierenden Keimlingen

Switching und Akkumulation am Berührungspunkt von MAK-2-GFP in interagierenden Keimlinge des Stammes N1-47 (*pccg-1-mak-2-gfp*, $\Delta mak-2$).

In dem untersuchten Stamm wurde *mak-2-gfp* mit Hilfe des starken *ccg-1*-Promotors exprimiert. Dieser enthält daher eine hohe Konzentration des MAK-2-GFP-Fusionsproteins, was die Visualisierung vereinfacht. Es wurde zuvor bereits gezeigt, dass die Lokalisierung von MAK-2-GFP sich in Stämmen, die das Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimieren, sich nicht von der Lokalisierung des Überexpressionsstamms unterscheidet [Fleissner et al., 2009]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auf eine Lokalisierung von MAK-2-GFP aus einem nativen Expressionshintergrund verzichtet.

3.1.2. MEK-2-GFP lokalisiert in interagierenden Keimlingen mit einer ähnlichen subzellulären Dynamik wie MAK-2

Die ungewöhnliche subzelluläre Dynamik von MAK-2 während der Keimlingsfusion führte zu der Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Aktivität der Kinasen gibt. Da eine Aktivierung von MAK-2 abhängig von der MAPKK MEK-2 und der MAPKKK NRC-1 ist [Kothe and Free, 1998; Pandey et al., 2004; Goebel, 2012], wurden diese Faktoren ebenfalls in interagierenden Keimlingen lokalisiert.

Eine Lokalisierung von MEK-2 mit dem nativen Promotor war aufgrund der sehr geringen Fluoreszenz in Keimlingen nicht möglich (siehe Abschnitt 3.1.3). Für die Lokalisierung von MEK-2 wurde daher das Plasmid p53 (*ptef-1-mek-2-gfp*) hergestellt, das *mek-2-gfp* unter der Kontrolle des starken *tef-1*-Promotors enthält. Das Plasmid wurde in den Stamm N1-03 (*his-3⁻, mata*) transformiert. Sporen von 20 erhaltenen Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und die Stämme MT-37-326 und MT-37-327 (*ptef-1-mek-2-gfp, mata*) mit dem stärksten Fluoreszenzsignal für weitere Analysen behalten. Der Stamm MT-37-327 (*ptef-1-mek-2-gfp, mata*) wurde anschließend mit dem Stamm N1-04 (*his-3⁻, mata*) gekreuzt, um homokaryotische Stämme zu erhalten. Die Sporen der 30 untersuchten Nachkommen wurden auf ihre Fluoreszenz analysiert, und die Stämme mit dem besten Fluoreszenzsignal für weitere Untersuchungen aufbewahrt. Der so entstandene Stamm MT-37-408 (*ptef-1-mek-2-gfp, mata*) wurde für die Fluoreszenzanalysen von MEK-2-GFP in interagierenden Keimlingen verwendet.

Mikroskopische Untersuchungen interagierender Keimlinge des Stammes MT-37-408 (*ptef-1-mek-2-gfp, mata*) zeigten, dass MEK-2-GFP in interagierenden Keimlingen eine ähnliche subzelluläre Dynamik wie MAK-2 aufweist. Während MEK-2-GFP an der Spitze des einen Keimlings lokalisiert, ist an der Spitze des Interaktionspartners kein GFP-Signal zu erkennen. Diese Lokalisation kehrt sich nach einigen Minuten um. Nun akkumuliert MEK-2-GFP an der Spitze des Interaktionspartners, während an der Spitze des ersten Keimlings kein Signal zu sehen ist. Dieses *Switching* wiederholt sich mehrere Male, bis die beiden Interaktionspartner sich berühren, und MEK-2-GFP an der Berührungsstelle akkumuliert (Abbildung 3.2).

3.1.3. NRC-1-GFP akkumuliert am Berührungspunkt interagierender Keimlinge

Aufgrund des geringen Fluoreszenzsignals von NRC-1-GFP in Keimlingen, die das *nrc-1-gfp*-Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimieren, konnten die Lokalisierungsstudien in diesen Stämmen nicht durchgeführt werden (siehe Abschnitt 3.1.2). Die Lokalisierung von NRC-1-GFP fand daher mit Hilfe von Stämmen statt, in denen *nrc-1-gfp* unter der Kontrolle des stärkeren *tef-1*-Promotors exprimiert wird. Hierzu wurden die Plasmide UB309 und UB310 (*ptef-1-nrc-1-gfp*) in den Stamm N1-03 (*his-3⁻, mata*) transformiert. Da das Fluoreszenzsignal in den Sporen der Transformanten zu gering war, um eine Selektion zu

3. Ergebnisse

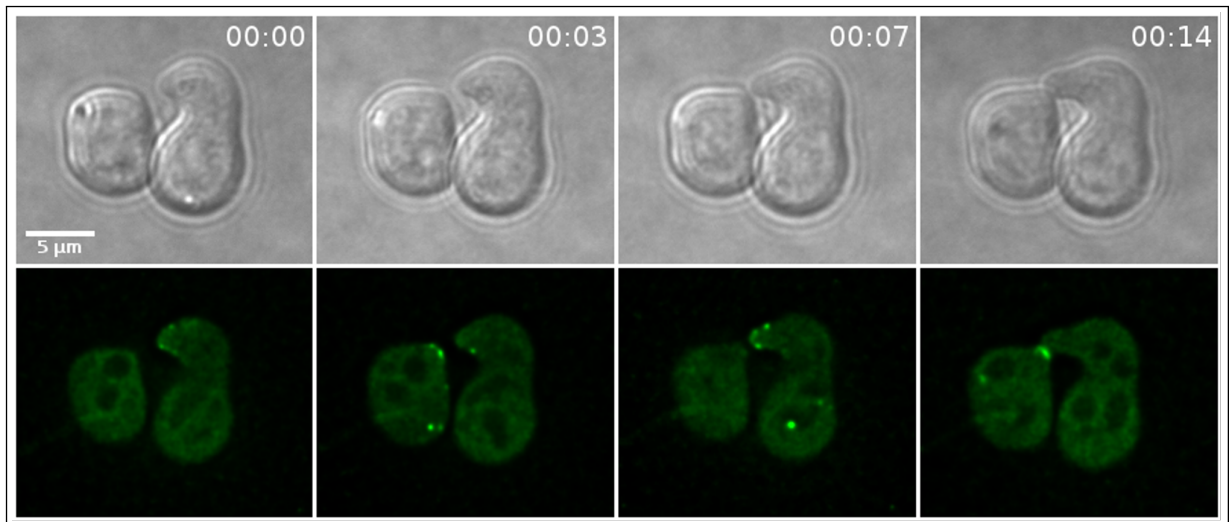


Abbildung 3.2.: Subzelluläre Lokalisierung von MEK-2-GFP in interagierenden Keimlingen

In interagierenden Keimlingen des Stammes MT-37-408 (*ptef-1-mek-2-gfp*) zeigt MEK-2-GFP eine ähnliche subzelluläre Dynamik wie MAK-2 und akkumuliert an der Berührungsstelle.

ermöglichen, wurde die Fluoreszenz in reifen Hyphen von 20 Transformanten untersucht. Die beiden Stämme PPS-07-402 und PPS-07-403 (*ptef-1-nrc-1-gfp, mata*) zeigten dabei deutliche Fluoreszenzsignale und wurden für weitere mikroskopische Analysen verwendet. Der Stamm PPS-07-402 wurde außerdem über eine Einzelsporisolierung aufgereinigt und der so erhaltene Stamm PPS-07-437, der die beste Fluoreszenz aufwies, ebenfalls mikroskopisch analysiert.

Aufgrund der geringen Fluoreszenz in Keimlingen konnte die Lokalisierung von NRC-1-GFP nicht eindeutig geklärt werden. Neben Keimlingen, in denen kein Fluoreszenzsignal an der Spitze der Interaktionspartner lokalisiert wurde, konnten auch Keimlinge beobachtet werden, in denen eine oszillierende Akkumulation von NRC-1-GFP an der Spitze von nur einem Interaktionspartner zu sehen war (Abbildung 3.3A). In einigen Fällen konnte auch ein Switching von einem zum anderen Keimling beobachtet werden, allerdings nie über einen längeren Zeitraum (Abbildung 3.3B). Nachdem die Keimlinge in physischen Kontakt treten, lokalisiert NRC-1-GFP deutlich am Berührungspunkt (Abbildung 3.3C). Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf eine ähnliche subzelluläre Dynamik von NRC-1, MEK-2 und MAK-2 während der Keimlingsfusion hin.

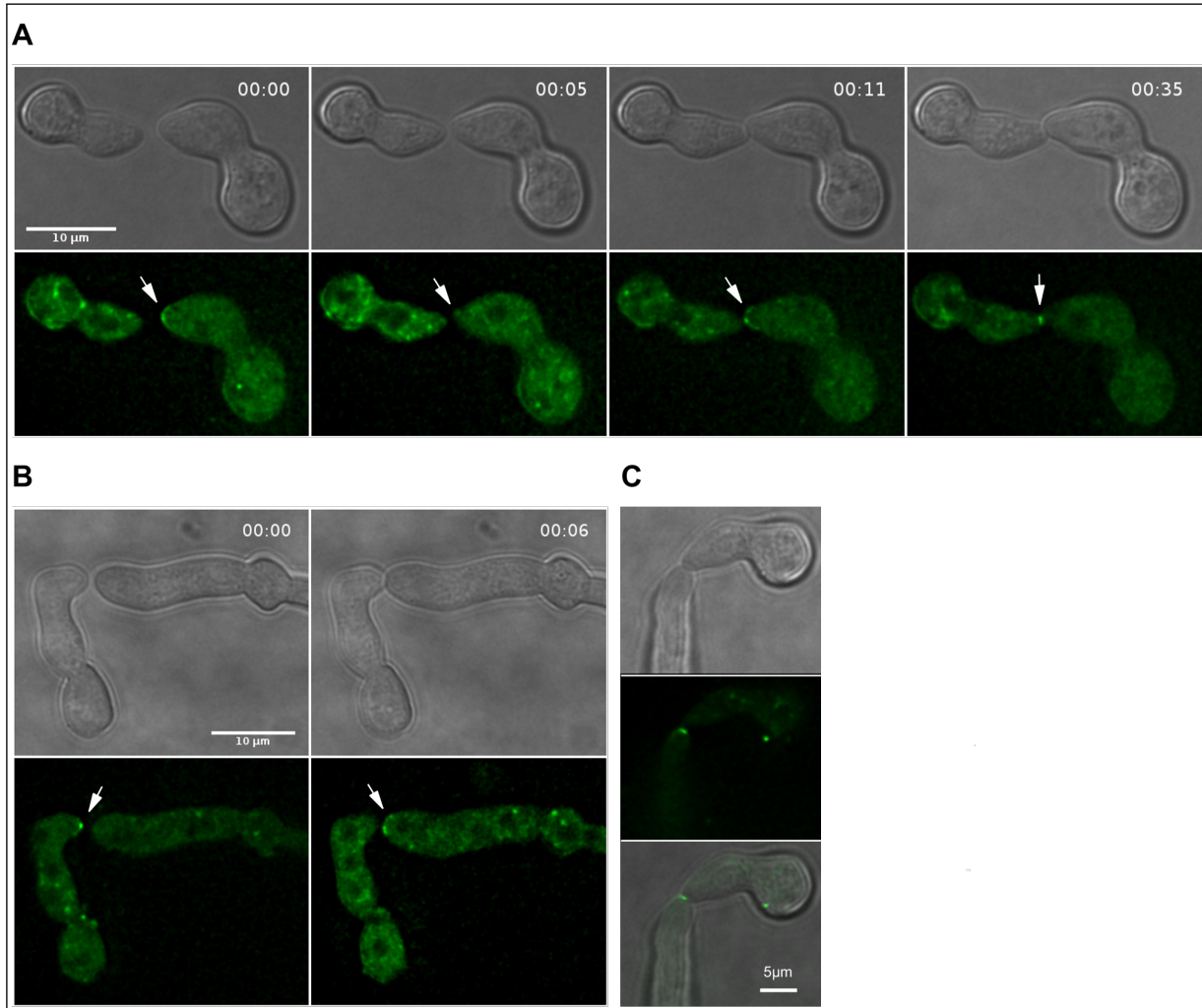


Abbildung 3.3.: Subzelluläre Lokalisierung von NRC-1-GFP in interagierenden Keimlingen

A) In interagierenden Keimlingen des Stammes PPS-07-403 (*ptef-1-nrc-1-gfp*) ist eine dynamische Lokalisation von NRC-1-GFP an der Spitze des rechten Keimlings zu sehen. Während das NRC-1-GFP-Signal zum Zeitpunkt null dort akkumuliert, ist es nach 5 Minuten verschwunden und lokalisiert nach elf Minuten erneut an der Spitze des rechten Keimlings. Nach der Herstellung eines physischen Kontakts zwischen den Interaktionspartnern konzentriert NRC-1-GFP sich an der Berührungsstelle. B) In interagierenden Keimlingen des Stammes PPS-07-437 (*ptef-1-nrc-1-gfp*) ist eine dynamische Lokalisierung von NRC-1 an der Spitze beider interagierender Keimlinge zu sehen. Während NRC-1-GFP zum Zeitpunkt null an der Spitze des linken Keimlings akkumuliert, lokalisiert es sechs Minuten später an der Spitze des rechten Keimlings. C) In Keimlingen des Stammes PPS-07-437 (*ptef-1-nrc-1-gfp*) akkumuliert NRC-1-GFP an der Berührungsstelle der Keimlinge.

3.1.4. Co-Lokalisierungen von Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade

Mikroskopische Untersuchungen der Komponenten der MAP-Kinasen-Kaskade deuten auf eine ähnliche subzelluläre Dynamik der drei Kinasen in interagierenden Keimlingen hin. Um zu testen, ob die Kinasen zeitgleich an die Membran der Keimlinge rekrutiert und ins Cytoplasma entlassen werden, wurden Co-Lokalisierungsstudien mit GFP- und CHERRY-Fusionsproteinen durchgeführt. Um beide Konstrukte in einem Keimling untersuchen zu können, wurden Heterokaryen aus auxotrophen Stämmen hergestellt.

MAK-2 und MEK-2 co-lokalisieren in Komplexen an der Spitze interagierender Keimlinge und am zukünftigen Fusionspunkt

Für die Co-Lokalisierungsexperimente mit MAK-2 und MEK-2 wurden auxotrophe Stämme hergestellt, die MAK-2-GFP, MAK-2-CHERRY, MEK-2-GFP oder MEK-2-CHERRY enthalten. Für die Expression von MAK-2-GFP-Fusionsprotein wurde das Plasmid pMH5.1 (*pccg-1-mak-2-gfp*) in den Stamm 435 (*his-3⁻, trp-1⁻*) transformiert. Es wurden Sporen von 10 Transformanten auf ihre Fluoreszenz untersucht. Die Stämme PPS-14-456 und PPS-14-458 (*pccg-1-mak-2-gfp, trp⁻*) wiesen das stärkste Fluoreszenzsignal auf und wurden für weitere Analysen verwendet. Für eine Co-Lokalisierung mit MEK-2-CHERRY wurde das Plasmid p43 (*pccg-1-mek-2-cherry*) hergestellt und in den auxotrophen Stamm 436 (*his-3⁻, nic-3⁻*) transformiert. Sporen von 13 erhaltenen Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und der Stamm PPS-09-443 (*pccg-1-mek-2-cherry, nic-3⁻*) mit dem stärksten Fluoreszenzsignal für weitere Analysen verwendet.

Um auxotrophe Stämme zu erhalten, die MEK-2-GFP enthalten, wurde das Plasmid p36 (*pccg-1-mek-2-gfp*) hergestellt und in den auxotrophen Stamm 435 (*his-3⁻, trp-1⁻*) transformiert. Es wurden Sporen von 17 Transformanten auf ihre Fluoreszenz untersucht und die Stämme PPS-13-454 und PPS-13-455 (*mek-2-gfp, trp-1⁻*), die das stärkste Fluoreszenzsignal aufwiesen, für die mikroskopischen Analysen verwendet. Für die Co-Lokalisierungen mit MAK-2-CHERRY wurde das Plasmid p72 (*ptef-1-mak-2-cherry*) hergestellt und in den Stamm 436 (*his-3⁻, nic-3⁻*) transformiert. Die Sporen von 11 Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz

untersucht und die Stämme PPS-10-445 und PPS-10-446 (*ptef-1-mak-2-cherry, nic-3*⁻), die sehr gute Fluoreszenzsignale aufwiesen, für Co-Lokalisierungsexperimente verwendet.

Für die Co-Lokalisierungsexperimente mit MAK-2 und MEK-2 wurden Heterokaryen zwischen den Stämmen PPS-14-456 (*pccg-1-mak-2-gfp, trp-1*⁻) und PPS-09-443 (*pccg-1-mek-2-cherry, nic-3*⁻), sowie PPS-14-458 (*pccg-1-mak-2-gfp, trp-1*⁻) und PPS-09-443 (*pccg-1-mek-2-cherry, nic-3*⁻) hergestellt, die MAK-2-GFP und MEK-2-CHERRY enthalten. Um Stämme zu erhalten, die MEK-2-GFP und MAK-2-CHERRY enthalten, wurden Heterokaryen zwischen den Stämmen PPS-13-454 (*mek-2-gfp, trp-1*⁻) und PPS-10-445 (*ptef-1-mak-2-cherry, nic-3*⁻), sowie PPS-13-455 (*mek-2-gfp, trp-1*⁻) und PPS-10-445 (*ptef-1-mak-2-cherry, nic-3*⁻) hergestellt.

Mikroskopische Analysen der Heterokaryen zeigten, dass MAK-2 und MEK-2 während der Keimlingsinteraktion gleichzeitig oszillierend an die Membran rekrutiert und von der Membran entlassen werden (Abbildung 3.4A). Dabei lokalisieren beide Proteine gemeinsam in Komplexen an der Plasmamembran (Abbildung 3.4B). Gelegentlich wurden außerdem einzelne Punkte an der Plasmamembran gefunden, die MEK-2, aber kein MAK-2 enthalten (Abbildung 3.4C). Nach der Herstellung physischen Kontakts zwischen den Fusionspartnern co-lokalisieren MAK-2 und MEK-2 am zukünftigen Fusionspunkt (Abbildung 3.4A und Abbildung 3.5). Im Verlauf der Fusion der Keimlinge akkumulieren MAK-2 und MEK-2 um die sich öffnende Fusionspore und verschwinden nach der erfolgten Fusion (Abbildung 3.5).

MAK-2 und NRC-1 co-lokalisieren am zukünftigen Fusionspunkt

Um MAK-2 und NRC-1 zu co-lokalisieren, wurden Heterokaryen mit Hilfe auxotropher Stämme hergestellt. Um den auxotrophen Stamm herzustellen, der NRC-1-GFP enthält, wurde das Plasmid UB310 (*ptef-1-nrc-1-gfp*) in den Stamm 435 (*his-3, trp-1*⁻) transformiert. Aufgrund der geringen Fluoreszenz der NRC-1-GFP-Fusionsproteine in Sporen wurde die Fluoreszenz in reifen Hyphen von 8 Transformanten untersucht. Der Stamm PPS-15-460 (*nrc-1-gfp, trp-1*⁻), der die beste Fluoreszenz aufwies, wurde anschließend über eine Einzelsporisolation aufgereinigt und so der Stamm PPS-15-464 (*nrc-1-gfp, trp-1*⁻) generiert.

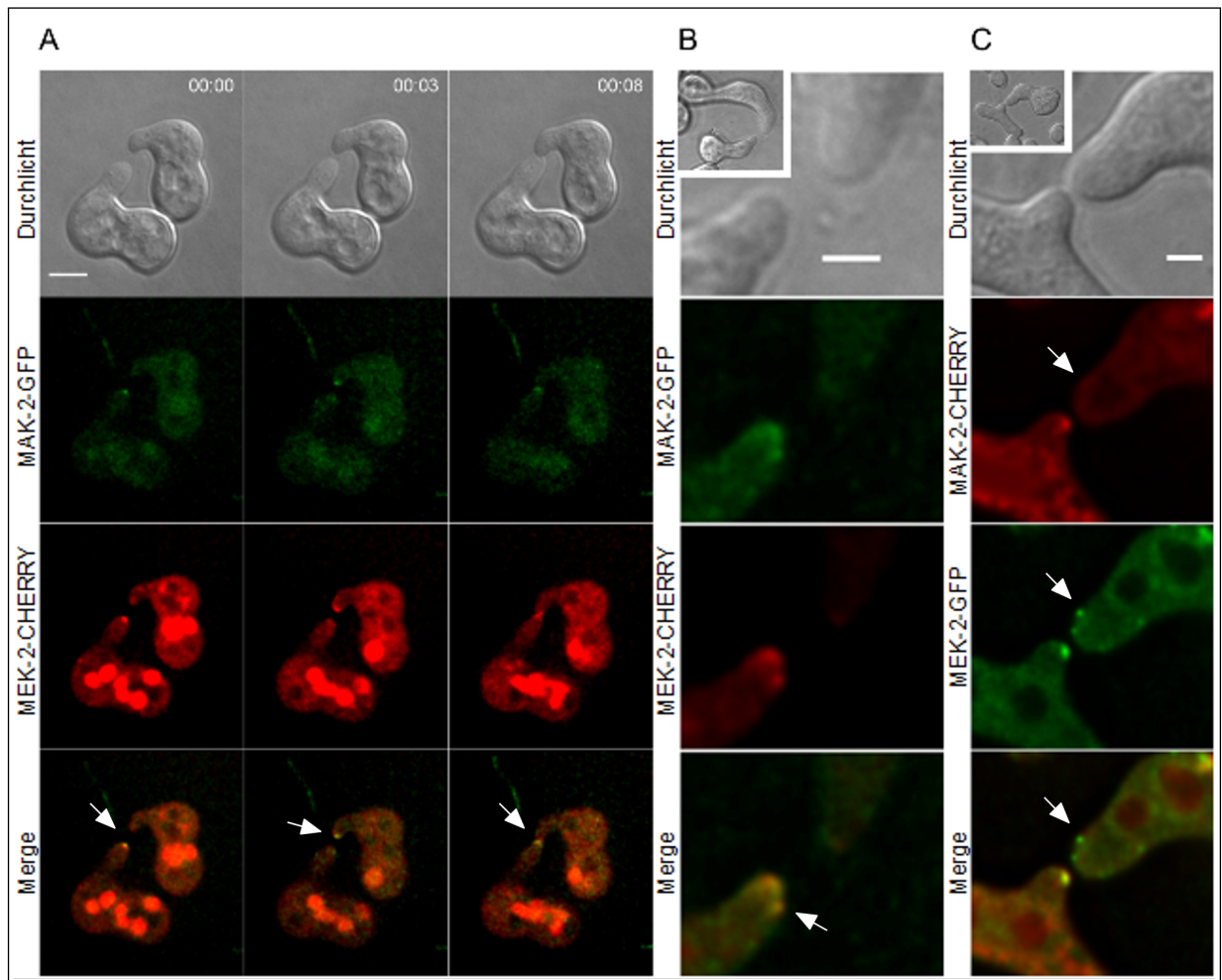


Abbildung 3.4.: Co-Lokalisierung von MAK-2- und MEK-2-Fluoreszenzproteinen

A) In interagierenden Keimlingen lokalisieren MAK-2-GFP und MEK-2-CHERRY gemeinsam oszillierend an den Spitzen interagierender Keimlinge und akkumulieren am späteren Fusionspunkt. Maßstab: 5 µm. B) Während des *Switching* lokalisieren MAK-2-GFP und MEK-2-CHERRY gemeinsam in Komplexen an der Spitze eines interagierenden Keimlings. Maßstab: 2 µm. C) Gelegentlich lokalisiert MEK-2(-GFP) in Komplexen, die kein MAK-2(-CHERRY) enthalten. Maßstab: 2 µm.

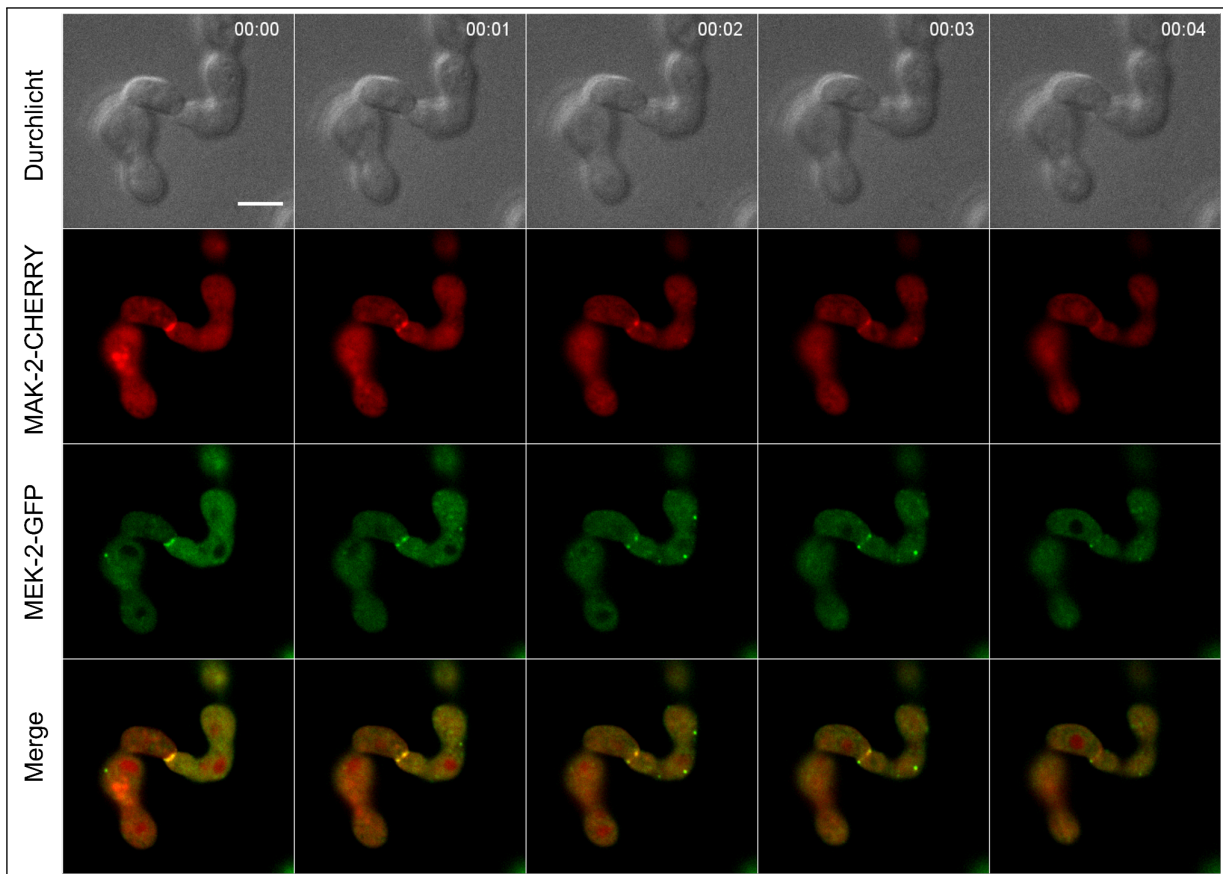


Abbildung 3.5.: Co-Lokalisierung von MAK-2 und MEK-2 am Fusionspunkt

MAK-2-CHERRY und MEK-2-GFP co-lokalisieren am Berührungspunkt interagierender Keimlinge und um die sich öffnende Fusionspore. Nach erfolgter Fusion verschwinden beide Proteine von der Fusionsstelle. Maßstab: 5µm.

3. Ergebnisse

Für die Co-Lokalisierungen wurden Heterokaryen zwischen den Stämmen PPS-15-464 (*nrc-1-gfp*, *trp-1*⁻) und PPS-10-446 (*mak-2-cherry*, *nic-3*⁻, Herstellung siehe Abschnitt 3.1.4) hergestellt. Aufgrund der geringen Fluoreszenz von NRC-1-GFP konnten MAK-2 und NRC-1 in interagierenden Keimlingen nicht gemeinsam lokalisiert werden. Eine deutliche Co-Lokalisierung von MAK-2 und NRC-1 wurde erst nach Berührung beider Keimlinge beobachtet, wenn beide Kinasen an der zukünftigen Fusionsstelle akkumulieren (Abbildung 3.6).

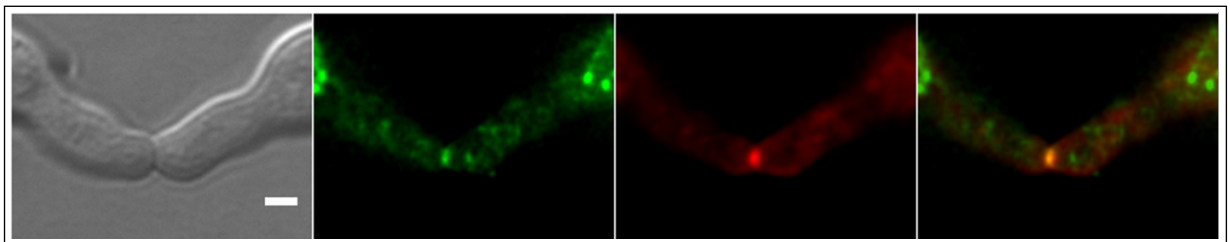


Abbildung 3.6.: Co-Lokalisierung von MAK-2-CHERRY und NRC-1-GFP am Berührungspunkt.
Maßstab: 2µm.

3.2. Lokalisierung der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade-Komponenten in reifen Hyphen

Die Lokalisierungsversuche der drei Kinasen der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade in Keimlingen zeigen eine sehr spezifische und hoch koordinierte subzelluläre Lokalisation aller drei Kinasen, was auf einen engen Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Funktion der Kinasen hindeutet. Um ein möglichst umfassendes Bild von der Lokalisierung der Kinasen zu erhalten, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit Lokalisierungsstudien in reifen Hyphen durchgeführt.

Da in Keimlingen der für die Expressionskonstrukte verwendete Promotor eine entscheidende Rolle für die Lokalisierung der Fusionsproteine spielt, wurden die Kinasen jeweils mit Hilfe unterschiedlicher Promotoren exprimiert und die entsprechenden Fusionsproteine auf ihre Lokalisierung untersucht.

3.2.1. MAK-2 akkumuliert in reifen Hyphen cytoplasmatisch, an den Septenporen und in den Zellkernen

Die Lokalisierungsexperimente mit MAK-2-GFP bzw. MAK-2-CHERRY wurden in den Stämmen MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry*), N1-40 (*pccg-1-mak-2-gfp*) und MT-34-325 (*ptef-1-mak-2-cherry*) durchgeführt, in denen die *mak-2*-Fusionskonstrukte mit Hilfe des nativen oder des *ccg-1*- bzw. *tef-1*-Promotors exprimiert werden. Um den Stamm MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry*) zu erhalten, wurde zunächst das Plasmid p62 (*pmak-2-mak-2-cherry*) hergestellt, das *mak-2-cherry* hinter dem nativen Promotor enthält. Das Plasmid wurde in den Stamm N1-03 (*his-3⁻, matA*) transformiert und Sporen von 7 erhaltenen Transformanten auf ihre Fluoreszenz untersucht. Der Stamm MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry*) wies das stärkste Fluoreszenzsignal auf und wurde daher für die weiteren Analysen verwendet. Für die Herstellung des Stammes MT-34-325 (*ptef-1-mak-2-cherry*) wurde das Plasmid p73 (*ptef-1-mak-2-cherry*) hergestellt und in den Stamm N1-03 (*his-3⁻, matA*) transformiert. Es wurden Sporen von 10 der erhaltenen Transformanten auf ihre Fluoreszenz untersucht und der Stamm MT-34-325 (*ptef-1-mak-2-cherry*) mit dem stärksten Fluoreszenzsignal für weitere Analysen verwendet.

Der Stamm MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry*), in dem *mak-2-cherry* unter Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wird, zeigt generell eine schwächere Fluoreszenz als die Stämme N1-40 (*pccg-1-mak-2-gfp*) und MT-34-325 (*ptef-1-mak-2-cherry*), in denen *mak-2-cherry* unter der Kontrolle des *ccg-1*- beziehungsweise *tef-1*-Promotors exprimiert wird. In allen drei Stämmen lokalisiert MAK-2 cytoplasmatisch und ist nicht aus den Zellkernen ausgeschlossen (Abbildung 3.7). In den Stämmen N1-40 (*pccg-1-mak-2-gfp*) und MT-34-325 (*ptef-1-mak-2-cherry*) ist außerdem eine Akkumulation von MAK-2 um die Septenpore zu sehen (Abbildung 3.7C und D). Diese Lokalisierung ist auch in dem Stamm MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry*) zu sehen, allerdings finden sich hier gelegentlich auch Septen, an denen kein verstärktes Fluoreszenzsignal detektierbar ist (3.7A und B).

Interessanterweise weist der Stamm MT-34-325 (*ptef-1-mak-2-cherry*) eine Besonderheit im Vergleich zu den anderen untersuchten Stämmen auf: es wurde eine starke Akkumulation von MAK-2-CHERRY in den Zellkernen gefunden (Abbildung 3.7D, gelbe Pfeile). Diese Lokalisierung wurde weder in dem Überexpressionsstamm N1-40 (*pccg-1-mak-2-gfp*) noch in dem

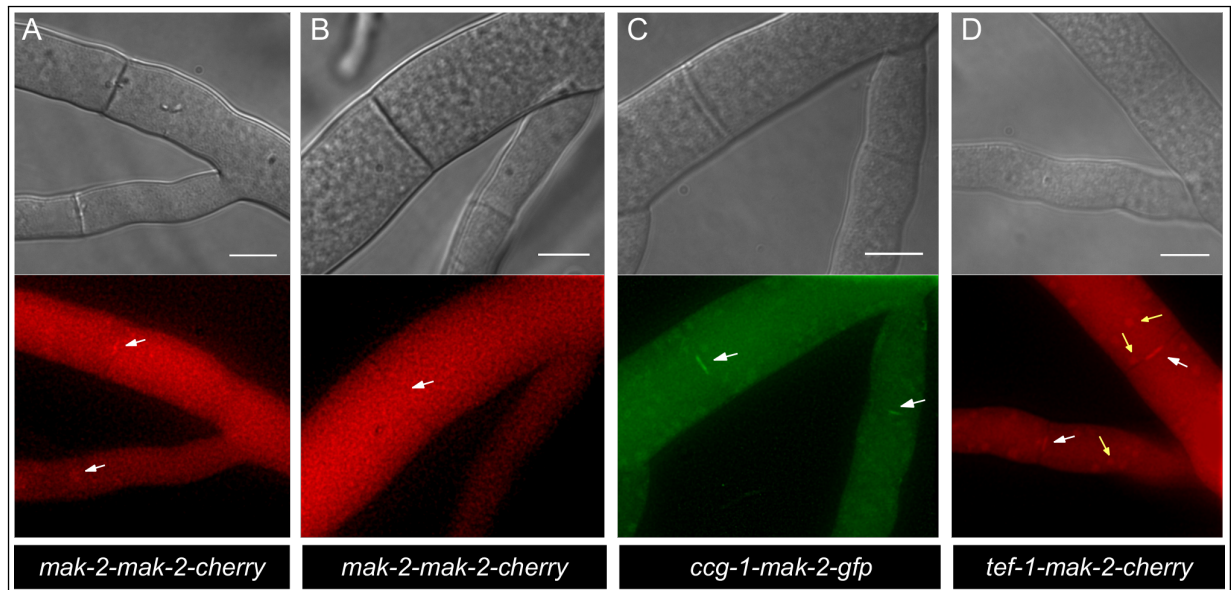


Abbildung 3.7.: MAK-2 lokalisiert in reifen Hyphen cytoplasmatisch

A+B) In dem Stamm MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry*) lokalisiert MAK-2-CHERRY unregelmäßig an den Septen (weiße Pfeile). C) In dem Stamm N1-40 (*pccg-1-mak-2-gfp*) akkumuliert MAK-2-GFP an den Septenporen reifer Hyphen (weiße Pfeile). D) In dem Stamm MT-34-325 (*ptef-1-mak-2-cherry*) lokalisiert MAK-2-CHERRY an den Septenporen reifer Hyphen (weiße Pfeile) und akkumuliert in den Zellkernen (gelbe Pfeile). Maßstab: 10 µm.

Stamm MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry*), in dem *mak-2-gfp* unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wird, beobachtet (Abbildung 3.7A-C).

Die Stämme N1-40 (*pccg-1-mak-2-gfp*) und MT-34-325 (*ptef-1-mak-2-cherry*) weisen außerdem eine Akkumulation von MAK-2 an der Spitze wachsender Hyphen auf (Abbildung 3.8B und C). Diese Lokalisierung konnte in den Stamm MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry*), in dem MAK-2-GFP unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wird, nicht beobachtet werden (Abbildung 3.8A).

3.2.2. MEK-2 akkumuliert in reifen Hyphen um die Septenporen

Um MEK-2 in reifen Hyphen zu lokalisieren, wurden Stämme mikroskopisch untersucht, die *mek-2*-Fluoreszenzkonstrukte unter der Kontrolle des nativen bzw. des starken *tef-1*-Promotors exprimieren. Für die Lokalisierungsanalysen mit MEK-2-GFP, das annähernd in physiologischen Mengen in der Zelle vorliegt, wurde der Stamm MT-36-300 hergestellt, in dem *mek-2-gfp* unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wird. Hierzu wurde das Plasmid p39

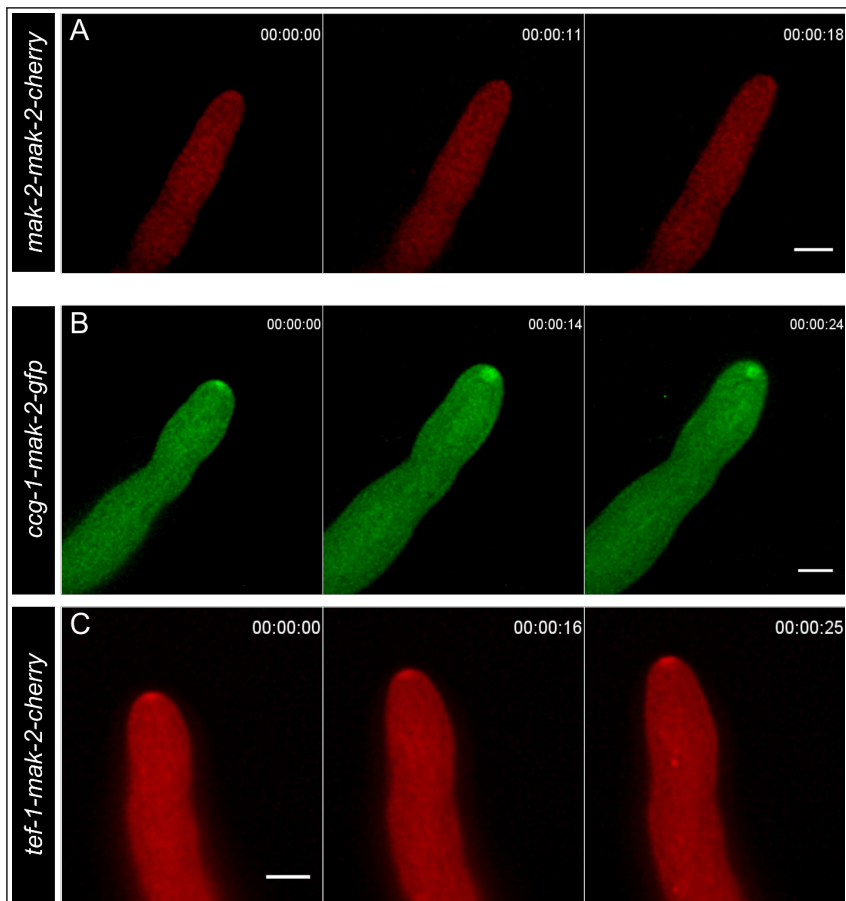


Abbildung 3.8.: Promotorabhängige Lokalisierung von MAK-2 an der Spitze wachsender Hyphen

A) Der Stamm MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry*) weist keine Akkumulation von MAK-2-CHERRY an der Spitze wachsender Hyphen auf. Maßstab: 5µm B+C) In den Stämmen N1-40 (*pccg-1-mak-2-gfp*) und MT-34-325 (*ptef-1-mak-2-cherry*) lokalisiert MAK-2-GFP bzw. MAK-2-CHERRY an der Spitze reifer wachsender Hyphen. Maßstab: 5µm.

(*pmek-2-mek-2-gfp*) in den Stamm N1-03 (*his-3*, *matA*) transformiert. Sporen von 8 erhaltenen Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und der Stamm MT-36-300 (*pmek-2-mek-2-gfp*), in dem ein eindeutiges Fluoreszenzsignal beobachtet wurde, für die weiteren Analysen verwendet.

Mikroskopische Analysen des Stammes MT-36-300 (*pmek-2-mek-2-gfp*) zeigten nur eine sehr geringe cytoplasmatische Fluoreszenz (Abbildung 3.10A). Analysen des Stammes MT-37-326 (*ptef-1-mek-2-gfp*, Herstellung siehe 3.1.2), in denen *mek-2-gfp* unter der Kontrolle des starken *tef-1*-Promotors exprimiert wird, zeigen dagegen ein klares cytoplasmatische MEK-2-Signal. Dabei ist zu beobachten, dass MEK-2-GFP im Gegensatz zu MAK-2 aus schwarzen Punkten im Cytoplasma ausgeschlossen ist, wobei vermutet wurde, dass es sich hierbei um die Zellkerne handelt (Abbildung 3.10C, Pfeile). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Heterokaryen der Stämme MT-37-326 (*ptef-1-mek-2-gfp*) und GN8-41 (*pccg-1-h1-dsRed*) hergestellt und MEK-2-GFP mit dem im Zellkern lokalisierenden Fusionsprotein H1-DsRED co-lokalisiert. Dabei wurde in Hyphen und Keimlingen gezeigt, dass H1-dsRED mit den schwarzen Punkten überlagert und nicht mit MEK-2-GFP co-lokalisiert (Abbildung 3.9A und B). Diese Beobachtung bestätigt, dass MEK-2-GFP in beiden Entwicklungsstadien aus den Zellkernen ausgeschlossen bleibt. In den Stämmen MT-36-300 (*pmek-2-mek-2-gfp*) und MT-37-326 (*ptef-1-mek-2-gfp*) wurde außerdem eine deutliche Akkumulation von MEK-2-GFP um die Septenpore herum beobachtet. Dabei zeigt sich in der Draufsicht oft ein kleines Loch in der Mitte des Septums (Abbildung 3.10A und B). Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um die Pore handelt, die frei von MEK-2-GFP bleibt. Um diese Vermutung genauer zu untersuchen wurden anhand von Schichtaufnahmen 3-D-Rekonstruktionen hergestellt. Diese zeigen deutlich, dass MEK-2-GFP in einem Ring um die Septenpore herum akkumuliert (Abbildung 3.10B und D).

Eine Akkumulation von MEK-2-GFP an wachsenden Spitzen reifer Hyphen konnte, im Gegensatz zu MAK-2, nicht beobachtet werden. Weder der Stamm MT-36-300 (*pmek-2-mek-2-gfp*) noch der Überexpressionsstamm MT-37-326 (*ptef-1-mek-2-gfp*) zeigten ein Fluoreszenzsignal an den Spitzen wachsender Hyphen (Abbildung 3.11).

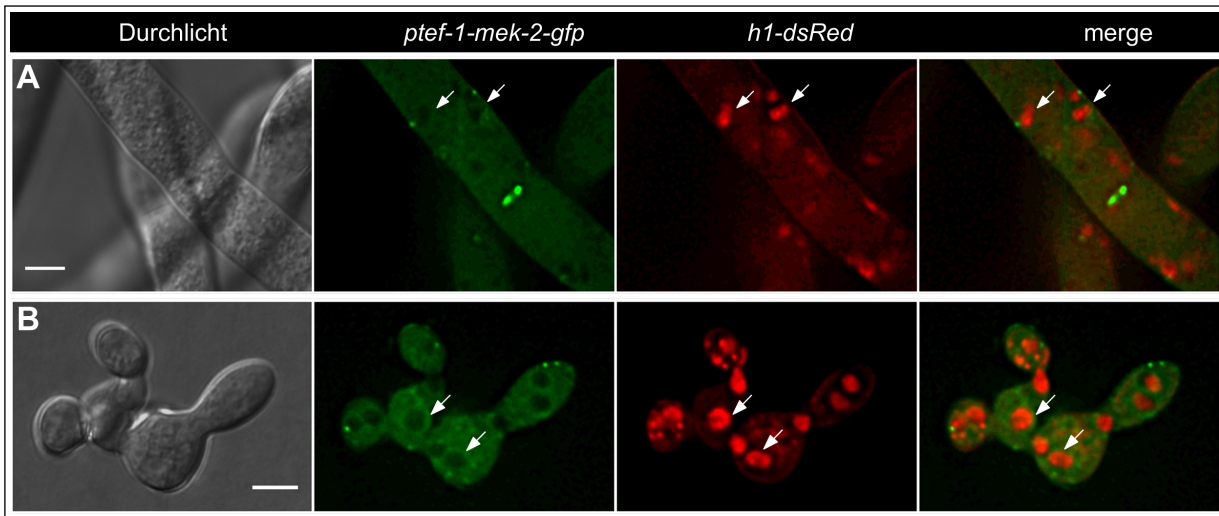


Abbildung 3.9.: Co-Lokalisierung von MEK-2-GFP und H1-dsRED

Die Co-Lokalisierungen von MEK-2-GFP und H1-dsRED zeigen, dass die beiden Fluoreszenzsignale in Hyphen (A) und Keimlingen (B) getrennt bleiben und nicht miteinander überlappen (weiße Pfeile). Maßstab: 5µm.

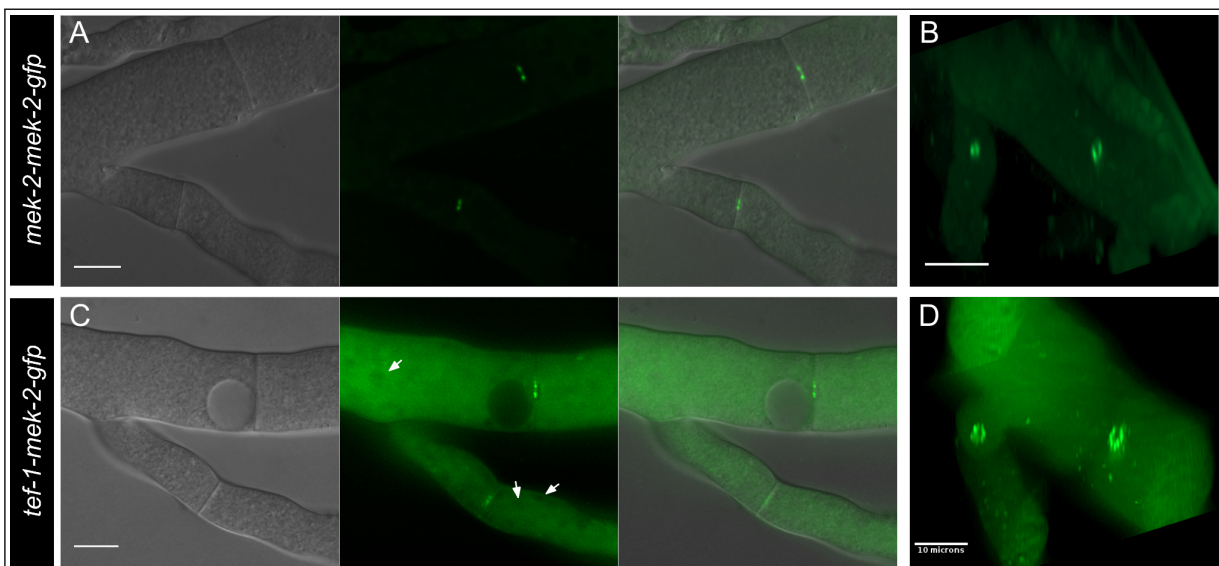


Abbildung 3.10.: MEK2-GFP akkumuliert an den Septenporen reifer Hyphen

A) In dem Stamm MT-36-300 (*pmek-2-mek-2-gfp*) akkumuliert MEK-2-GFP deutlich an den Septenporen, während das cytoplasmatische Signal extrem schwach ist. Maßstab: 10µm. B) Eine 3-D-Rekonstruktion zeigt deutlich die Ringstruktur der Pore, um die MEK-2-GFP akkumuliert. Maßstab: 10µm. C) Der Stamm MT-37-326 (*ptef-1-mek-2-gfp*) exprimiert *mek-2-gfp* mit Hilfe des starken *tef-1*-Promotors, was zu einer Überexpression des Fusionsproteins führt. Es ist ein starkes cytoplasmatisches Fluoreszenzsignal zu sehen, wobei MEK-2-GFP aus den Zellkernen ausgeschlossen ist (Pfeile). Deutlich akkumuliert MEK-2-GFP an den Septenporen, was anhand der 3-D-Rekonstruktion (D) veranschaulicht wird. Maßstab: 10µm.

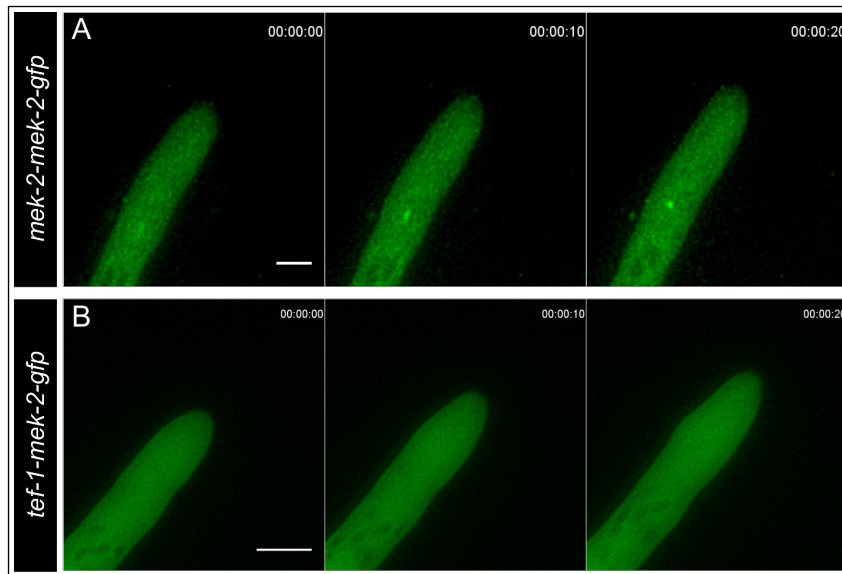


Abbildung 3.11.: MEK2-GFP akkumuliert nicht an den Spitzen wachsender Hyphen

In wachsenden Hyphen der Stämme A) MT-36-300 (*pmek-2-mek-2-gfp*) und B) MT-37-326 (*ptef-1-mek-2-gfp*) akkumuliert MEK-2-GFP nicht an Spitzen wachsender Hyphen. Maßstab: 10µm.

3.2.3. NRC-1 akkumuliert in reifen Hyphen um die Septenporen

Für die Lokalisierung von NRC-1-GFP wurden die Stämme PPS-06-417 und 314 hergestellt, die *nrc-1-gfp* unter der Kontrolle des nativen bzw. des starken *ccg-1*-Promotors exprimieren. Hierzu wurden die Plasmide UB104 (*pnrc-1-nrc-1-gfp*) und UB82 (*pccg-1-nrc-1-gfp*) in den Stamm N2-42 ($\Delta nrc-1$, *his-3*⁻) transformiert. Die erhaltenen Transformanten komplementierten den makroskopischen Phänotyp der Deletionsmutante. Hyphen von 10 bzw. 8 erhaltenen Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und der Stamm PPS-06-417 (*pnrc-1-nrc-1-gfp*) bzw. 314 (*pccg-1-nrc-1-gfp*) mit dem deutlichsten Fluoreszenzsignal für weitere Studien verwendet.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten eine vergleichbare Lokalisierung von NRC-1-GFP in den Stämmen PPS-06-417 (*pnrc-1-nrc-1-gfp*) und 314 (*pccg-1-nrc-1-gfp*), in denen *nrc-1-gfp* unter der Kontrolle des nativen beziehungsweise des *ccg-1*-Promotors exprimiert werden. Besonders in dem Stamm PPS-06-417 (*pnrc-1-nrc-1-gfp*) ist kaum ein cytoplasmatisches Fluoreszenzsignal zu erkennen (Abbildung 3.12A). Eine Lokalisierung von NRC-1-GFP an wachsenden Spitzen reifer Hyphen war daher in diesem Stamm nicht möglich. In den Stämmen

PPS-06-417 (*pnrc-1-nrc-1-gfp*) und 314 (*pccg-1-nrc-1-gfp*) akkumuliert NRC-1-GFP deutlich um die Septenpore (Abbildung 3.12A und B). Eine Lokalisierung an den Spitzen wachsender Hyphen konnte auch in dem Stamm PPS-06-417 (*pnrc1-nrc1-gfp*) nicht beobachtet werden (Abbildung 3.12C).

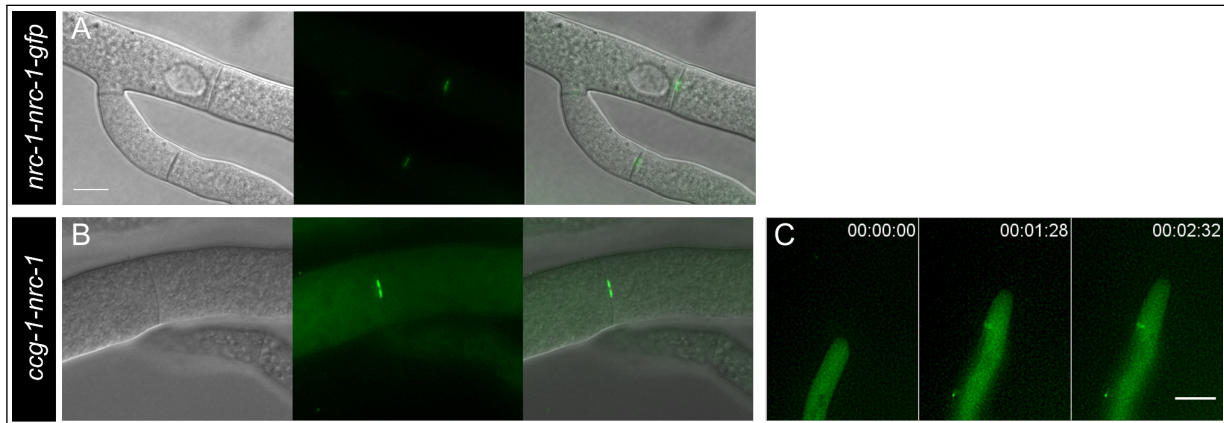


Abbildung 3.12.: NRC1-GFP akkumuliert an den Septenporen reifer Hyphen

A) In dem Stamm PPS-06-417 (*pnrc1-nrc1-gfp*) akkumuliert NRC-1-GFP an der Septenpore und ist im Cytoplasma kaum detektierbar. B) In dem Stamm 314 (*pccg1-nrc1-gfp*) akkumuliert NRC1-GFP an den Septenporen und ist in geringen Mengen auch im Cytoplasma detektierbar. C) An den Spitzen wachsender Hyphen wurde keine verstärkte Lokalisierung von NRC1 beobachtet.

3.3. Artifizielle Missrekrutierung von Komponenten der MAP-Kinasen-Kaskade

In interagierenden Keimlingen weist die MAP-Kinase MAK-2 eine räumlich und zeitlich hoch koordinierte subzelluläre Dynamik auf, die in beiden Keimlingen exakt aufeinander abgestimmt wird [Fleissner et al., 2009]. Diese hohe Koordination deutet auf einen engen Zusammenhang zwischen der subzellulären Lokalisierung und der Funktion der Kinase hin. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurde die subzelluläre Dynamik von MAK-2 durch das anhängen einer Farnesylierungssequenz an den C-Terminus vollständig unterbrochen [Lemanski, 2010]. Diese Farnesylierungs- oder auch CAAX-Sequenz führt zu einer permanenten Membranlokalisation und verhindert die für die dynamische Lokalisation von MAK-2 notwendige Entlassung ins Cytoplasma. Die CAAX-Sequenz wird in der Zelle prozessiert, indem ein Isoprenoid (Farnesylrest) über eine Thioesterverbindung kovalent mit dem Cystein verbunden wird. Daraufhin durchgeht die Sequenz weitere Prozessierungen, die schließlich zur Membranlokalisierung führen (ausführlich beschrieben in [Wright and Philips, 2006]). Der Farnesylrest dient dabei als lipophiler Anker und vermittelt eine permanente Assoziation der Kinase mit Membranen. Die veränderte Kinase MAK-2-GFP-CAAX wird durch den Farnesylanker an Membranen rekrutiert und kann sich nicht mehr frei in der Zelle bewegen. Das GFP dient hierbei der Visualisierung in der Zelle und somit der Kontrolle. Untersuchungen von Stämmen, die *mak-2-gfp-caax* exprimieren deuten darauf hin, dass die subzelluläre Dynamik von MAK-2 während der Keimlingsinteraktion essentiell für die Funktion der Kinase ist. Die Analysen wurden jedoch durch geringe Fluoreszenzsignale von MAK-2-GFP-CAAX an der Plasmamembran erschwert. Die starke Anhäufung von MAK-2-GFP-CAAX in den Vakuolen untersuchter Keimlinge deutet auf einen schnellen Abbau von MAK-2-GFP-CAAX hin [Lemanski, 2010]. Es sollte daher in dieser Arbeit nach einer Möglichkeit gesucht werden, die Visualisierbarkeit von MAK-2-GFP-CAAX in Keimlingen zu verbessern.

Es ist allgemein bekannt und wurde auch in dieser Studie bereits gezeigt, dass der für die Expression von Fluoreszenzkonstrukten eingesetzte Promotor einen gravierenden Einfluss auf die Intensität resultierender Fluoreszenzsignale ausübt (siehe Abschnitt 3.1 und 3.2). Durch die Auswahl eines geeigneten Promotors sollte daher in dieser Arbeit die Expression von künstlich

farnesylierten Proteinen verbessert werden. In den resultierenden Stämmen sollte anschließend der Einfluss der Membranbeschränkung von MAK-2-GFP-CAAX auf die Funktion und Aktivität der Kinase untersucht werden.

3.3.1. Der *tef-1*-Promotor ist ein geeigneter Promotor für die Visualisierung von MAK-2-GFP-CAAX-Fusionsproteinen in Keimlingen

Um ein verbessertes Fluoreszenzsignal von CAAX-modifizierten Proteinen in Keimlingen zu erhalten, wurde das *mak-2-gfp-caax*-Fusionskonstrukt mit der Hilfe von vier unterschiedlichen Promotoren exprimiert. Die verwendeten Promotoren waren der native *mak-2*-Promotor, der in *N. crassa* häufig für Fluoreszenzstudien verwendeten Promotor *ccg-1* (*clock-controlled gene 1*) [Loros et al., 1989; McNally and Free, 1988; Freitag et al., 2004], und die beiden Promotoren *tef-1* (*translation elongation factor 1 α*) aus *N. crassa* [Ichi-ishi and Inoue, 1995; Berepiki et al., 2010] und *gpd-1* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) aus *Aspergillus nidulans* [Punt et al., 1988; Dementhon et al., 2006]. Es wurden entsprechende Plasmide hergestellt, die die jeweilige Promotorsequenz gefolgt von dem *mak-2-gfp-caax*-Fusionskonstrukt enthalten, und in *N. crassa* transformiert. Die erhaltenen Expressionsstämme wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert, wobei ein besonderer Fokus auf die Fluoreszenzsignale in Keimlingen gelegt wurde.

Um das *mak-2-gfp-caax*-Konstrukt mit Hilfe des nativen *mak-2*-Promotors zu exprimieren wurde das Plasmid p22 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*) hergestellt und in den *N. crassa*-Stamm N1-03 (*matA*, *his-3*⁻) transformiert. Es wurden Sporen von 12 Transformanten auf ihre Fluoreszenz untersucht. Der Stamm MT-17-180 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, *matA*), der das intensivste Fluoreszenzsignal enthielt, wurde mit dem Stamm N1-04 (*mata*, *his-3*⁻) rückgekreuzt, um homokaryotische Stämme zu erhalten. Sporen von 8 erhaltenen Nachkommen wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und der Stamm MT-17-353 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*) mit dem intensivsten Fluoreszenzsignal für weitere Analysen verwendet. Der Stamm MT-12-89 (*pccg-1-mak-2-gfp-caax*) enthält das *mak-2-gfp-caax*-Konstrukt unter der Kontrolle des *ccg-1*-Promotors (Herstellung beschrieben in [Lemanski, 2010]). Für die Expression von *mak-2-gfp-caax* unter der Kontrolle des *gpd-1*-Promotors wurde das Plasmid p17 (*pgpd-mak-2-gfp-caax*) hergestellt und

3. Ergebnisse

in den *N. crassa*-Stamm N1-03 (*matA*, *his-3*⁻) transformiert. Sporen von sechs erhaltenen Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz überprüft und der Stamm MT-15-122 (*pgpd-1-mak-2-gfp-caax*, *matA*) mit dem stärksten Fluoreszenzsignal mit dem Stamm N1-02 (*mata*) rückgekreuzt, um homokaryotische Stämme zu erhalten. Die Sporen von 20 Nachkommen wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht und der Stamm MT-15-659 (*pgpd-1-mak-2-gfp-caax*) für weitere Analysen behalten. Um *mak-2-gfp-caax* unter der Kontrolle des *tef-1*-Promotors zu exprimieren wurde das Plasmid p26 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) hergestellt und in den Stamm N1-03 (*matA*, *his-3*⁻) transformiert. Sporen von 12 erhaltenen Transformanten wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Stamm MT-19-187 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*), dessen Sporen gute, aber unregelmäßige Fluoreszenzsignale aufwiesen, wurde unabhängig voneinander über eine Einzelsporisolierung und eine Rückkreuzung mit dem Stamm N1-04 (*mata*, *his-3*⁻) aufgereinigt. Die Sporen von 10 Einzelsporisolaten und von 10 Kreuzungsnachkommen wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und die Stämme MT-19-192 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) und MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*), die jeweils gleichmäßige intensive Fluoreszenzsignale aufwiesen, für weitere Analysen verwendet. Die Fluoreszenzsignale der hergestellten Stämme wurde fluoreszenzmikroskopisch in Hyphen und Keimlingen untersucht und die verschiedenen Promotoren miteinander verglichen.

In reifen Hyphen zeigten die Stämme MT-17-353 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*) und MT-15-659 (*pgpd-1-mak-2-gfp-caax*) nur sehr geringe Fluoreszenzsignale an der Plasmamembran. Die höchsten Fluoreszenzintensitäten befanden sich dabei an den Septen (Abbildung 3.13A und C). Auch in Hyphen des Stammes MT-19-192 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*), der insgesamt eine deutlich stärkere Fluoreszenz aufwies, ist das Signal nur sehr schwach an der Plasmamembran und stärker an den Septen zu erkennen (Abbildung 3.13D). Das beste Fluoreszenzsignal in reifen Hyphen ist in dem Stamm MT-12-89 (*pccg-1-mak-2-gfp-caax*) zu erkennen, der das Fluoreszenzprotein mit Hilfe des in *N. crassa* etablierten *ccg-1*-Promotors exprimiert. In diesem Stamm ist das Fluoreszenzsignal deutlich an der Plasmamembran und am stärksten an den Septen zu erkennen (Abbildung 3.13B).

In Keimlingen der untersuchten Stämme zeigte sich ein anderes Muster. Hier waren die stärksten Fluoreszenzsignale jeweils in den Vakuolen der untersuchten Keimlinge zu sehen. An der Plasmamembran von Keimlingen der Stämme MT-17-353 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*),

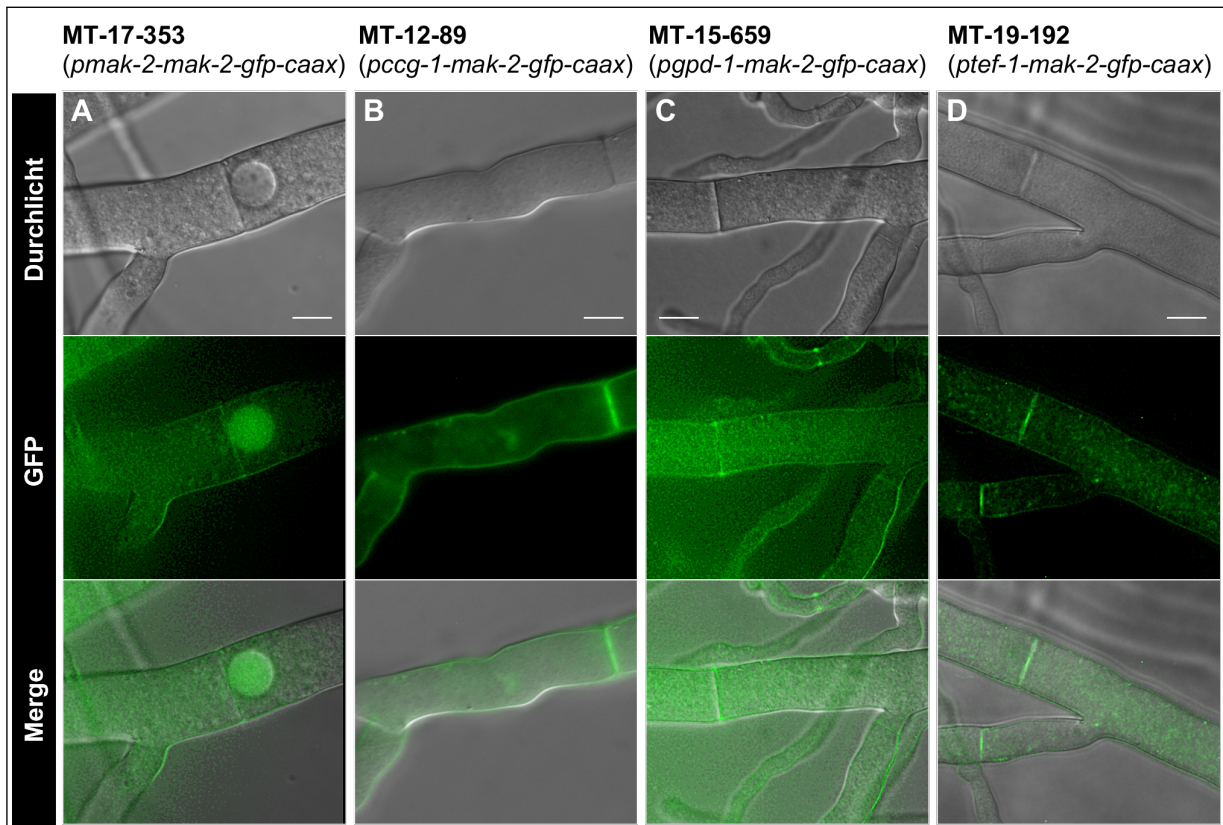


Abbildung 3.13.: Expression von *mak-2-gfp-caax* in reifen Hyphen unter der Verwendung unterschiedlicher Promotoren

A) In reifen Hyphen der Stämme MT-17-353 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*), B) MT-15-659 (*pgpd-1-mak-2-gfp-caax*) und D) MT-19-192 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) ist eine schwache Fluoreszenz an der Plasmamembran zu erkennen, die an den Septen am deutlichsten zu sehen ist. C) In reifen Hyphen des Stammes MT-12-89 (*pccg-1-mak-2-gfp-caax*) lokalisiert MAK-2-GFP-CAAX deutlich an der Plasmamembran. Maßstab: 10µm.

MT-12-89 (*pccg-1-mak-2-gfp-caax*) und MT-15-659 (*pgpd-1-mak-2-gfp-caax*) konnten dagegen nur gelegentlich Fluoreszenzsignale detektiert werden (Abbildung 3.14A, B und C). Lediglich Keimlinge des Stammes MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) zeigten regelmäßig gut detektierbare Fluoreszenzsignale an der Plasmamembran. Dabei verteilt sich das Fluoreszenzsignal über die gesamte Plasmamembran des Keimlings, wobei die Intensität des Signals auch in nicht-interagierenden Keimlingen häufig weitläufig um die Spitze des Keimschlauchs am intensivsten ist. Das deutlichste Fluoreszenzsignal ist allerdings auch in diesem Stamm in den Vakuolen zu detektieren (Abbildung 3.14D). Die auffällige Vakuolenlokalisation von MAK-2-GFP-CAAX in Keimlingen aller untersuchten Stämme deutet insgesamt auf einen schnellen Abbau von membrangebundenen MAK-2 hin. Die Untersuchungen zeigen außerdem, dass der *ccg-1*-Promotor geeignet für eine Lokalisation von MAK-2-GFP-CAAX in reifen Hyphen ist, während der *tef-1*-Promotor in Keimlingen die besten Fluoreszenzsignale an der Plasmamembran zeigt. Da ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung von beteiligten Faktoren während der Zell-Zell-Kommunikation in Keimlingen liegt, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit Stämme hergestellt und verwendet, die das *mak-2-gfp-caax*- und weitere Konstrukte unter der Kontrolle des *tef-1*-Promotors exprimieren.

3.3.2. Einführung einer SAAX-Kontrolle

Jede künstliche Veränderung von Proteinen kann zu Artefakten führen, wie beispielsweise unerwartete dreidimensionalen Strukturen, die die Funktion des Proteins beeinflussen können [Andresen et al., 2004]. Die genaue Vorhersage von Proteinstrukturen bleibt bis in die heutige Zeit eine große Herausforderung, die noch nicht zufriedenstellend gelöst werden konnte [Khoury et al., 2014]. Um in dieser Arbeit mögliche unerwünschte Artefakte zu erkennen, die durch die Manipulation von MAK-2 entstehen können, wurde zusätzlich eine sogenannte SAAX-Kontrolle eingeführt. Die entsprechenden Kontrollstämme enthalten eine C-terminale (GFP-)SAAX-Sequenz, die, bis auf einen Austausch des Cysteins in der CAAX-Box gegen die Aminosäure Serin (SAAX), identisch mit der CAAX-Sequenz ist. Durch diesen Aminosäureaustausch kann die Sequenz nicht farnesyliert werden, sodass die SAAX-Sequenz keine Membranverankerung vermittelt. Es wird also erwartet, dass mögliche Artefakte die z.B. durch eine veränderte Proteinfaltung entstehen, aufgrund der Sequenzähnlichkeiten auch den

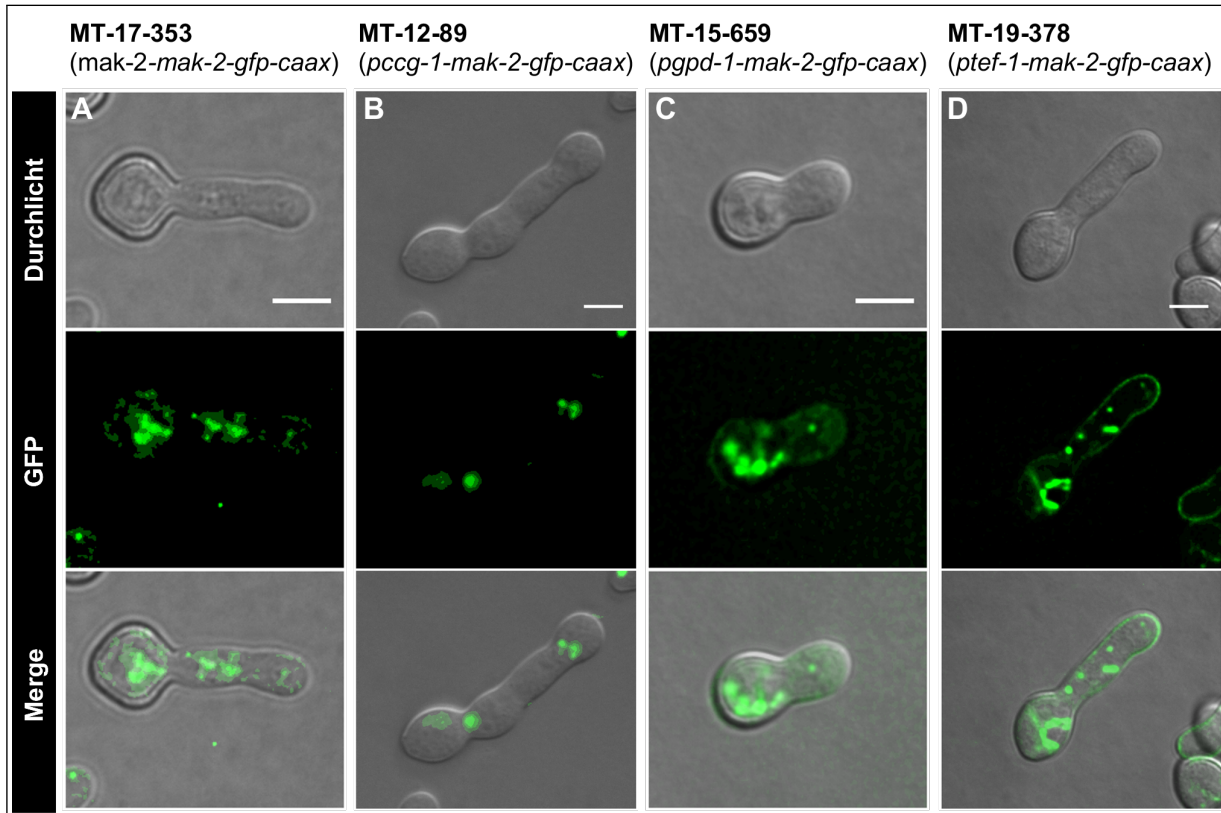


Abbildung 3.14.: Expression von *mak-2-gfp-caax* in Keimlingen unter der Verwendung unterschiedlicher Promotoren

A) In Keimlingen des Stammes MT-17-353 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*), B) MT-12-89 (*pccg-1-mak-2-gfp-caax*) und C) MT-15-659 (*pgpd-1-mak-2-gfp-caax*) akkumuliert MAK-2-GFP-CAAX stark in den Vakuolen. D) In Keimlingen des Stammes MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) lokalisiert MAK-2-GFP-CAAX stark in den Vakuolen und ist an der Plasmamembran zu sehen. Maßstab: 5µm.

saax-Kontrollstamm betreffen, während Beobachtungen, die auf die Membranverankerung von MAK-2-GFP-CAAX zurückzuführen sind, nur in den *caax*-Stämmen auftreten. Durch die Fusion der Proteine mit GFP können sie in der Zelle visualisiert werden, wodurch die erwartete subzelluläre Lokalisation kontrolliert werden kann.

In dieser Arbeit wurden daher Kontrollstämme hergestellt, die *mak-2-gfp-saax* unter der Kontrolle des nativen und des stärkeren *tef-1*-Promotors im Wildtyp-Hintergrund bzw. im Δ *mak-2*-Hintergrund exprimieren. Die Lokalisation der MAK-2-GFP-SAAX-Konstrukte wurde in reifen Hyphen und in Keimlingen untersucht und mit der Lokalisation von MAK-2-GFP verglichen. Anhand dieser Analysen konnten erste Rückschlüsse über die Funktionalität der SAAX-Konstrukte und somit ihre Eignung als Kontrolle gezogen werden. Eine genaue Analyse der makroskopischen Phänotypen und Komplementationsanalysen finden sich in den Abschnitten 3.3.3 und 3.3.4.

Da die Lokalisierungsstudien der CAAX-Fusionsproteine mit Konstrukten durchgeführt werden sollten, die mit Hilfe des starken *tef-1*-Promotor exprimiert werden (siehe Abschnitt 3.3.1), wurden zunächst Teststämme hergestellt, die *mak-2-gfp-saax* ebenfalls unter der Kontrolle des *tef-1*-Promotors exprimieren. Hierzu wurden die Plasmide p66 und p68 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*) hergestellt und in den Wildtyp N1-03 (*his-3⁻, matA*) transformiert. Die Sporen von je 10 erhaltenen Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und die Stämme MT-49-305 und MT-49-307 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, matA*), die das intensivste Fluoreszenzsignal aufwiesen, behalten. Um homokaryotische Stämme zu erhalten wurden die Stämme MT-49-305 und MT-49-307 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, matA*) mit dem Wildtyp-Stamm N1-04 (*his-3⁻, mata*) rückgekreuzt. Aus dieser Kreuzung sollten außerdem Nachkommen mit dem Paarungstyp *matA* erhalten werden, die später zur Herstellung weiterer *saax*-Kontrollstämme über eine Kreuzung mit *matA*-Stämmen genutzt werden können. Sporen von 6 bzw. 18 Nachkommen wurden daher auf ihre Fluoreszenz und den Paarungstyp überprüft. In den Stämmen MT-49-359 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, mata*) und MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, matA*), die eine sehr gute Fluoreszenz aufwiesen, wurde das Vorhandensein des *ptef-1-mak-2-gfp-saax*-Konstrukts zusätzlich per PCR verifiziert. Der Stamm MT-49-359 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, mata*), der den Paarungstyp *matA* aufweist, wurde zur Herstellung weiterer Stämme über eine Kreuzung verwendet, während die Stämme MT-49-307 und MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, matA*) für die

mikroskopischen Untersuchungen verwendet wurden. Die Lokalisation von MAK-2-GFP-SAAX in diesen Stämmen wurde anschließend mit der Lokalisation von MAK-2-GFP in dem Stamm MT-66-545 (*ptef-1-mak-2-gfp, matA*, Herstellung siehe [Letz, 2014]) verglichen.

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen in interagierenden Kemlingen zeigten, dass MAK-2-GFP bzw. MAK-2-GFP-SAAX oszillierend an den Spitzen der Interaktionspartner lokalisieren und nach Herstellung eines Zellkontaktes zwischen den Interaktionspartnern am Berührungspunkt akkumulieren (Abbildung 3.15A und B). Dabei war kein Unterschied in der dynamischen Lokalisation von MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX zu erkennen. Auch die Lokalisation der beiden Fusionsproteine in reifen Hyphen unterschied sich nicht voneinander. MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX lokalisieren in reifen Hyphen der Stämme MT-66-545 (*ptef-1-mak-2-gfp, matA*) und MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, matA*) cytoplasmatisch und akkumulieren an den Septen, im Zellkern und an den Spitzen schnell wachsender Hyphen (Abbildung 3.18A und B). Die Lokalisation von MAK-2-GFP-SAAX entspricht somit der erwarteten Lokalisation und zeigt, dass der SAAX-Anker die Lokalisation und somit vermutlich die Funktion der Kinase unter diesen Expressionsbedingungen nicht einschränkt.

Da die Lokalisation der Kinase in starkem Maße von dem zur Expression verwendeten Promotor abhängt (siehe Abschnitt 3.2.1), sollte die Lokalisation von MAK-2-GFP-SAAX in Stämmen bestätigt werden, die das Konstrukt mit Hilfe des nativen Promotors exprimieren. Um einen Stamm herzustellen, der *mak-2-gfp-saax* unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert, wurden die Plasmide p64 und p65 hergestellt (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*) und in den Stamm N1-03 (*his-3⁻, matA*) transformiert. Die Sporen von je 10 Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und die Stämme MT-27-303 und MT-27-304 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax, matA*), welche jeweils das stärkste Fluoreszenzsignal aufwiesen, behalten. Um homokaryotische Stämme herzustellen und Stämme des Paarungstyps *mata* für weitere Kreuzungen zu erhalten, wurden die Stämme MT-27-303 und MT-27-304 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax, matA*) mit dem Wildtyp N1-04 (*his-3⁻, mata*) rückgekreuzt. Je Kreuzung wurden Sporen von 20 Nachkommen verwendet um die Fluoreszenz zu untersuchen und den Paarungstyp zu ermitteln. Die Stämme MT-27-371 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax, mata*) und MT-27-358 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax, matA*), die jeweils das stärkste Fluoreszenzsignal aufwiesen, wurden für weitere Analysen verwendet. Die Lokalisation von MAK-2-GFP-SAAX in diesen Stämmen wurde mit der Lokalisation

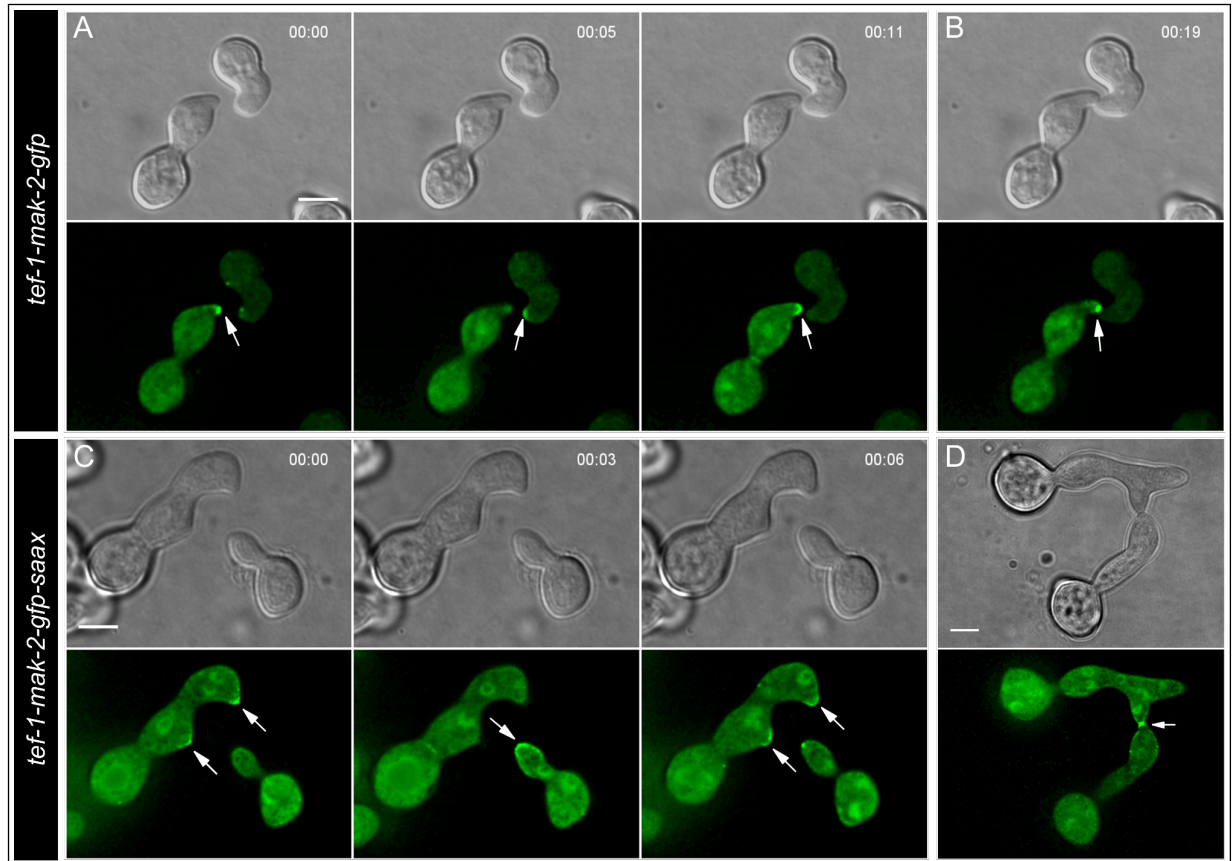


Abbildung 3.15.: Vergleichende Lokalisation von überexprimiertem MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX im Wildtyp-Hintergrund

Unter der Kontrolle des starken *tef-1*-Promotors im Wildtyp-Hintergrund exprimiertes A+B) MAK-2-GFP und C+D) MAK-2-GFP-SAAX lokalisiert oszillierend an den Spitzen interagierender Keimlinge und akkumuliert am Berührungspunkt der Interaktionspartner. Maßstab: 5µm.

von MAK-2-CHERRY, das in dem Stamm MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry, matA*, Herstellung siehe Abschnitt 3.2.1) ebenfalls im Wildtyp-Hintergrund mit Hilfe des nativen Promotors exprimiert wird, verglichen.

Die mikroskopischen Analysen zeigten, dass die Intensität des Fluoreszenzsignals in den Stämmen MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry, matA*) und MT-27-358 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax, matA*), in denen MAK-2-CHERRY bzw. MAK-2-GFP-SAAX mit Hilfe des nativen Promotors exprimiert wird, geringer ist als in den zuvor beobachteten Stämmen MT-66-545 (*ptef-1-mak-2-gfp, matA*) und MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, matA*), in denen das jeweilige Fusionsprotein mit Hilfe des stärkeren *tef-1*-Promotors exprimiert wird. Das Signal war aber jeweils stark genug, um die Dynamik von MAK-2-CHERRY (Abbildung 3.16A) bzw. MAK-2-GFP-SAAX (Abbildung 3.16C) in interagierenden Keimlingen und die Akkumulation der jeweiligen MAK-2-Fusionsproteine am Berührungspunkt zu beobachten (Abbildung 3.16C und D). Auch hier zeigten sich wie erwartet keine Unterschiede in der Lokalisation zwischen MAK-2-CHERRY und MAK-2-GFP-SAAX.

In ausgewachsenen Hyphen der Stämme MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry, matA*) und MT-27-371 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax, mata*) ist MAK-2-CHERRY bzw. MAK-2-GFP-SAAX gleichmäßig im Cytoplasma und im Zellkern verteilt und akkumuliert häufig an den Septen (Abbildung 3.7A und B in Abschnitt 3.2.1 bzw. Abbildung 3.20A). Während in wachsenden Spitzen des Stammes MT-33-296 (*pmak-2-mak-2-cherry, matA*) keine Akkumulation von MAK-2-CHERRY beobachtet wurde (Abbildung 3.8A in Abschnitt 3.2.1), konnte MAK-2-GFP-SAAX in dem Stamm MT-27-371 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax, mata*) an den Spitzen wachsender Hyphen beobachtet werden (Abbildung 3.20A). Diese Lokalisation stimmt mit der in dieser Arbeit ermittelten Lokalisation von überexprimiertem MAK-2-GFP überein (Abbildung 3.18A und C und Abbildung 3.8B und C) und wurde auch für natives MAK-2-GFP berichtet [Dettmann et al., 2012]. Die Lokalisation von MAK-2-GFP-SAAX in Keimlingen und reifen Hyphen entspricht daher trotz Abweichungen zu der gefundenen Lokalisation von MAK-2-CHERRY an den Spitzen reifer Hyphen den Erwartungen.

Die vergleichbare Lokalisation von MAK-2-GFP-SAAX und MAK-2-GFP bzw. MAK-2-CHERRY ist ein Hinweis darauf, dass der SAAX-Anker keinen Einfluss die Funktion von MAK-2 hat.

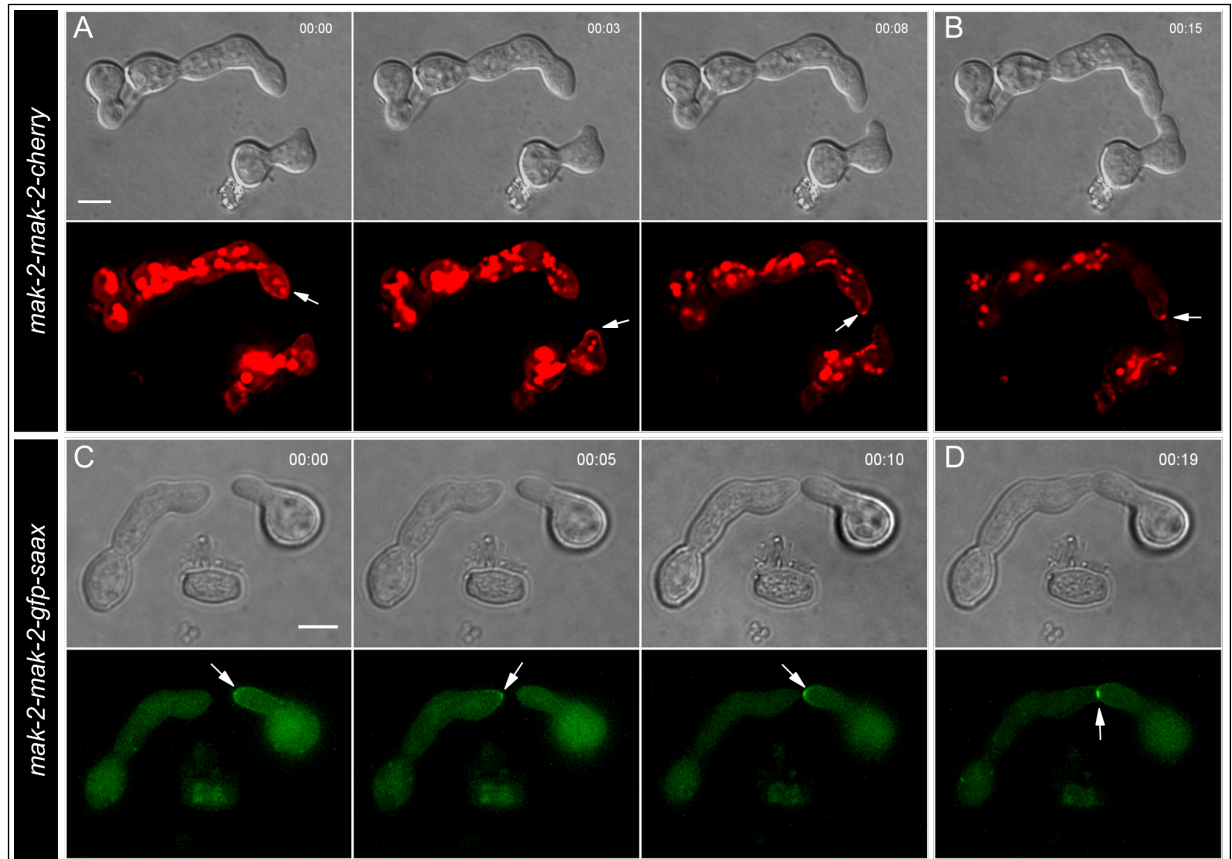


Abbildung 3.16.: Vergleichende Lokalisation von MAK-2-CHERRY- und MAK-2-GFP-SAAX-Fusionsproteinen, die mit Hilfe des nativen Promotors im Wildtyp-Hintergrund exprimiert wurden
Mit Hilfe des nativen *mak-2*-Promotors im Wildtyp-Hintergrund exprimiertes A+B) MAK-2-CHERRY und C+D) MAK-2-GFP-SAAX lokalisiert oszillierend an den Spitzen interagierender Keimlinge und akkumuliert am Berührungspunkt. Maßstab: 5µm.

Um diese Vermutung zu testen, wurde *mak-2-gfp-saax* im *mak-2*-Deletionshintergrund exprimiert. Es wurde erwartet, dass die entsprechenden Stämme makroskopisch wie der Wildtyp aussehen und gerichtete Interaktionen der Keimlinge stattfinden, wenn MAK-2-GFP-SAAX die Funktion von nativem MAK-2 zumindest teilweise übernehmen kann. Um dies zu überprüfen wurden der makroskopische und mikroskopische Phänotyp der erhaltenen Stämme analysiert (Abschnitt 3.3.3) und die subzelluläre Lokalisation in Keimlingen und Hyphen bestimmt.

Um das *ptef-1-mak-2-gfp-saax*-Konstrukt in die Δ *mak-2*-Mutante einzubringen, wurde der Stamm MT-49-359 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, *mata*) mit der Δ *mak-2*-Mutante N1-37 (*mak-2*, *his-3*⁻, *matA*) gekreuzt. Da die Askosporen der *mak-2*-Deletionsmutante lethal sind, war das Auskeimen der Askosporen bereits ein erster Hinweis auf eine Komplementation des Deletionsphänotyps durch das *mak-2-gfp-saax*-Konstrukt. Sporen von 20 erhaltenen Nachkommen wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und der Stamm MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, Δ *mak-2*) mit dem intensivsten Fluoreszenzsignal für weitere Analysen verwendet. Das Vorhandensein des *ptef-1-mak-2-gfp-saax*-Konstrukts und der Hygromycin-Kassette, sowie die Abwesenheit des nativen *mak-2*-Gens wurden anschließend per PCR überprüft. Um die Lokalisation von MAK-2-GFP-SAAX in den erhaltenen Stämmen mit der Lokalisation von MAK-2-GFP unter den gleichen Expressionsbedingungen vergleichen zu können, sollte *mak-2-gfp* unter der Kontrolle des *tef-1*-Promotors in die Δ *mak-2*-Mutante eingebracht werden. Hierzu wurde das allgemeine Plasmid 76 (*ptef-mak-2-gfp*) in den Stamm mak6.2.1 (Δ *mak-2*, *his-3*⁻, *al-1*⁻, *matA*^{Dip?}) transformiert. Sporen von 10 erhaltenen Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und der Stamm MT-60-635 (*ptef-1-mak-2-gfp*, Δ *mak-2*) mit dem intensivsten Signal für mikroskopische Analysen verwendet.

Makroskopisch weist der erhaltene *saax*-Stamm MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, Δ *mak-2*) einen ähnlichen Phänotyp wie der Wildtyp auf (Abbildung 3.22A) und mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Keimlinge des Stammes miteinander interagieren (Abschnitt 3.3.3). Während des gerichteten Wachstums lokalisieren MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX oszillierend an den Spitzen der interagierenden Keimlinge (Abbildung 3.17A und C) und akkumulieren am Berührungspunkt (Abbildung 3.17B und D). In reifen Hyphen lokalisieren MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX cytoplasmatisch und akkumulieren an den Septen, den Spitzen wachsender Hyphen und in den Zellkernen (Abbildung 3.18C und D). Diese Ergebnisse zeigen, dass

3. Ergebnisse

die Lokalisation von überexprimiertem MAK-2-GFP-SAAX mit der Lokalisation von MAK-2-GFP übereinstimmt und beide Fusionskonstrukte den Deletionsphänotyp der *mak-2*-Mutante komplementieren.

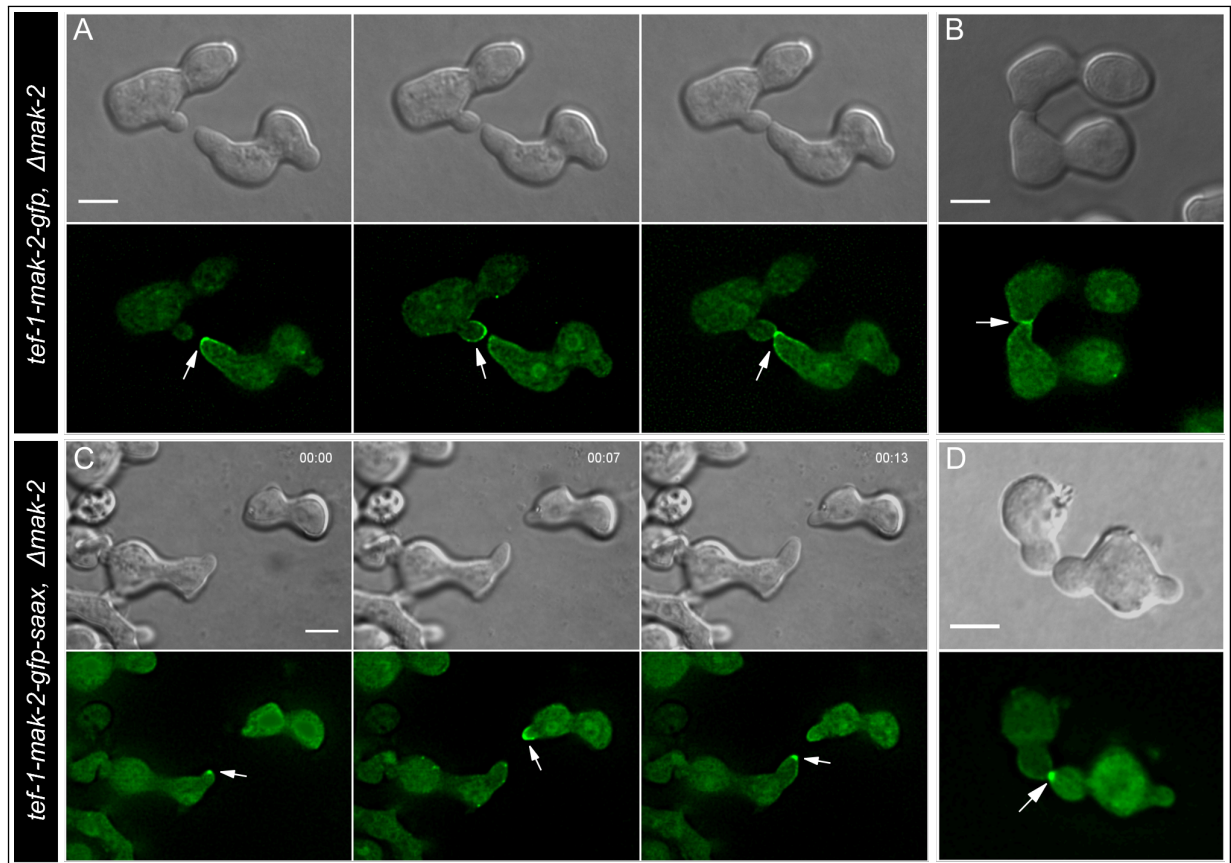


Abbildung 3.17.: Vergleichende Lokalisation von überexprimiertem MAK-2-GFP und MAK-2GFP-SAAX im $\Delta mak-2$ -Hintergrund

Unter der Kontrolle des starken *tef-1*-Promotors im *mak-2*-Deletionshintergrund exprimiertes MAK-2-GFP (A+B) und MAK-2-GFP-SAAX (C+D) lokalisieren oszillierend an den Spitzen interagierender Keimlinge und akkumulieren am Berührungspunkt der Interaktionspartner. Maßstab: 5 μ m.

Da die Überexpression von Proteinen zu Artefakten führen kann, wurde zuletzt noch überprüft, ob MAK-2-GFP-SAAX den Deletionsphänotyp der $\Delta mak-2$ -Mutante auch komplementiert, wenn es mit Hilfe des nativen Promotors exprimiert wird. Um *pmak-2-mak-2-gfp-saax* in die $\Delta mak-2$ -Mutante einzubringen, wurden zwei verschiedene Strategien gewählt. Zum einen wurden die Plasmide p64 und p65 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*) in die *mak-2*-Deletionsmutante mak6.2.1 ($\Delta mak-2$, *his-3*⁻, *al-1*⁻, *matA*^{Dip?}) transformiert. Sporen von je 5 erhaltenen Transformatanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und die Stämme MT-38-647 und MT-38-648

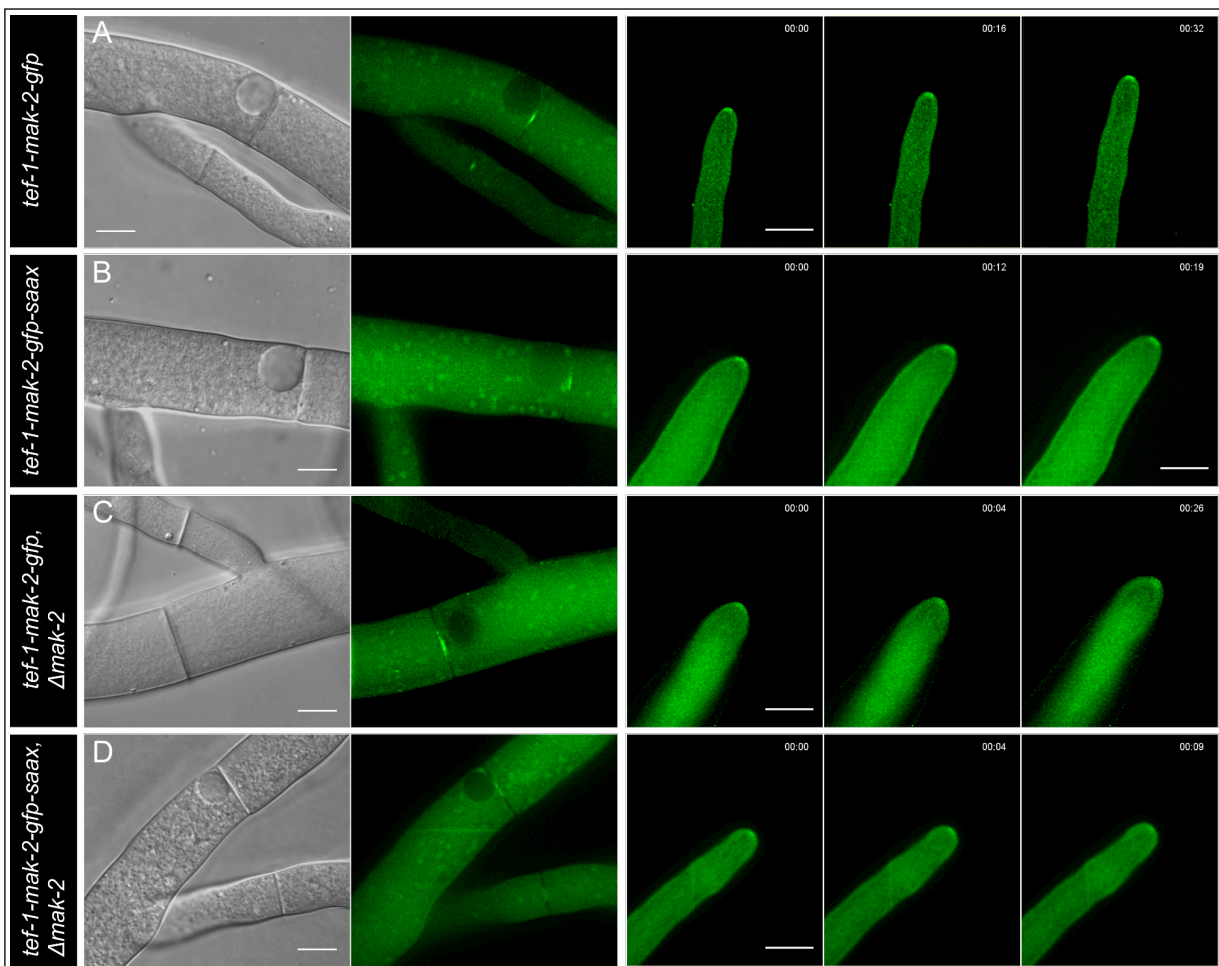


Abbildung 3.18.: Vergleichende Lokalisation von überexprimiertem MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX in reifen Hyphen

Unter der Kontrolle des starken *tef-1*-Promotors exprimiertes MAK-2-GFP bzw. MAK-2-GFP-SAAX lokalisiert A) bzw. B) im Wildtyp-Hintergrund und C) bzw. D) im *mak*-Deletions-Hintergrund cytoplasmatisch und akkumuliert an den Septen, in den Zellkernen und an den Spitzen wachsender Hyphen. Maßstab: 10 μ m.

(*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) mit dem intensivsten Fluoreszenzsignal über eine Einzelsporisolation aufgereinigt. Die Sporen von 10 bzw. 9 Einzelsporisolaten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und die Stämme MT-38-653 und MT-38-654 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$), die jeweils das stärkste und gleichmäßigste Fluoreszenzsignal aufwiesen, für weitere Analysen verwendet. In einem zweiten Ansatz wurde *mak-2-gfp-saax* über eine Kreuzung in die $\Delta mak-2$ -Mutante eingebracht. Hierzu wurde der Stamm MT-27-371 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, *mata*) mit der $\Delta mak-2$ -Mutante N1-37 (*mak-2*, *his-3*, *matA*) gekreuzt. Sporen von 8 erhaltenen Nachkommen wurden auf ihre Fluoreszenz überprüft und der Stamm MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$), der das beste Fluoreszenzsignal aufwies, für weitere Analysen verwendet. Das *mak-2-gfp-saax*-Konstrukt wurde in diesem Stamm sequenziert, und das Vorhandensein der Hygromycin-Resistenzkassette, sowie die Abwesenheit des nativen *mak-2*-Gens durch eine PCR überprüft.

Der Erhalt von Kreuzungsnachkommen und der makroskopische Phänotyp der Stämme MT-38-404 (Abbildung 3.22A), MT-38-653 und MT-38-654 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$), der dem des Wildtyps sehr ähnelt, deuten auf eine Komplementation der *mak-2*-Deletionsdefekte durch *mak-2-gfp-saax* hin. Um die Lokalisation von MAK-2-GFP-SAAX in den erhaltenen Stämmen mit der Lokalisation von nativ exprimiertem MAK-2-GFP im Deletionshintergrund zu vergleichen, wurde der entsprechende Stamm MT-82-655 (*pmak-2-mak-2-gfp*, $\Delta mak-2$) hergestellt. Hierzu wurde das Plasmid pPMH6.1 (*pmak-2-mak-2-gfp*) in den *mak-2*-Deletionsstamm mak6.2.1 ($\Delta mak-2$, *his-3*, *al-1*, *matA^{Dip?}*) transformiert und Sporen von 10 erhaltenen Transformanten auf ihre Fluoreszenz untersucht. Der Stamm MT-82-649 (*pmak-2-mak-2-gfp*, $\Delta mak-2$), dessen Sporen eine ungleichmäßige Fluoreszenz aufwiesen, wurde über eine Einzelsporisolation aufgereinigt. Sporen von 10 Einzelsporisolaten wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht und der Stamm MT-82-655 (*pmak-2-mak-2-gfp*, $\Delta mak-2$) für weitere Analysen verwendet.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Keimlingen der Stämme MT-38-653, MT-38-654 und MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) bzw. MT-82-655 (*pmak-2-mak-2-gfp*, $\Delta mak-2$) erwiesen sich unerwarteterweise als schwierig. Obwohl eine vollständige Komplementation und ausreichend gute Lokalisierbarkeit von nativ exprimiertem MAK-2-GFP im Deletionshintergrund berichtet wurde [Fleissner et al., 2009], konnten diese Ergebnisse in

dieser Arbeit nur teilweise reproduziert werden. Obwohl an dieser Stelle keine genaue Quantifizierung durchgeführt wurde, wurde beobachtet, dass Keimlinge des Stammes MT-82-655 (*pmak-2-mak-2-gfp*, $\Delta mak-2$) seltener interagieren als Keimlinge des Wildtyps (Abschnitt 3.3.3) und diese Interaktionen während der fluoreszenzmikroskopischen Analysen häufiger abbrechen. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Zellkommunikation nicht so stabil funktioniert wie im Wildtyp. Die Visualisierung von MAK-2-GFP war durch diese äußeren Faktoren aber auch durch die geringe Fluoreszenzintensität erschwert. In Keimlingen, die erfolgreich miteinander interagierten, konnte MAK-2-GFP jedoch wie zuvor beschrieben oszillierend an den Spitzen interagierender Keimlinge und später am Berührungspunkt beobachtet werden (Abbildung 3.19A und B). Keimlinge der Stämme MT-38-653 und MT-38-654, sowie des Stammes MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$), die unabhängig voneinander über eine Kreuzung bzw. eine Transformation hergestellt wurden, waren in den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nicht von Keimlingen des Stammes MT-82-655 (*pmak-2-mak-2-gfp*, $\Delta mak-2$) zu unterscheiden. Sie zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Anzahl an Keimlingsinteraktionen (Abschnitt 3.3.3). In erfolgreich interagierenden Keimlingen konnte aber auch hier die dynamische Lokalisation von MAK-2-GFP-SAAX an den Spitzen der Interaktionspartner und später am Berührungspunkt der Keimlinge beobachtet werden (Abbildung 3.19C und D).

In reifen Hyphen des Stammes MT-82-655 (*pmak-2-mak-2-gfp*, $\Delta mak-2$) lokalisiert MAK-2-GFP cytoplasmatisch und an den Septen. Wie zuvor für den Stamm MT-33-296 beschrieben, der *mak-2-cherry* unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert, konnte MAK-2-GFP in dem Stamm MT-82-655 (*pmak-2-mak-2-gfp*, $\Delta mak-2$) nicht an den Spitzen schnell wachsender Hyphen beobachtet werden (Abbildung 3.20B). Im Gegensatz dazu wurde durch den nativen *mak-2*-Promotor exprimiertes MAK-2-GFP-SAAX in dem Stamm MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) gelegentlich an den Spitzen schnell wachsender Hyphen beobachtet. Des Weiteren lokalisiert MAK-2-GFP-SAAX in reifen Hyphen gleichmäßig cytoplasmatisch und in den Zellkernen und akkumuliert an den Septen (Abbildung 3.20C).

Insgesamt zeigen diese umfangreichen mikroskopischen Untersuchungen von MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX, dass die beiden Fusionsproteine sich in ihrer Lokalisation kaum oder gar nicht voneinander unterscheiden und den Deletionsphänotyp der $\Delta mak-2$ -Mutante je nach

3. Ergebnisse

Expressionshintergrund in vergleichbarem Umfang komplementieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass der GFP-SAAX-Anker die Funktion von MAK-2 nicht weiter einschränkt als der GFP-Anker allein. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass der SAAX-Anker die Lokalisation von MAK-2 nicht beeinflusst und wie vermutet nicht zu einer Membranassoziation von MAK-2 führt. Damit wurde bestätigt, dass die SAAX-Sequenz eine geeignete Kontrolle zu der CAAX-Sequenz darstellt, die in den folgenden Kapiteln verwendet wurde, um gezielt die Lokalisation von MAK-2 zu manipulieren.



Abbildung 3.19.: Vergleichende Lokalisation von MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX, die mit Hilfe des nativen Promotors im *mak-2*-Deletionshintergrund exprimiert wurden

Mit Hilfe des nativen *mak-2*-Promotors im Δ *mak-2*-Hintergrund exprimiertes MAK-2-GFP (A+B) und MAK-2-GFP-SAAX (C+D) lokalisiert an den Spitzen interagierender Keimlinge und deutlich am Berührungspunkt. Maßstab: 5µm.

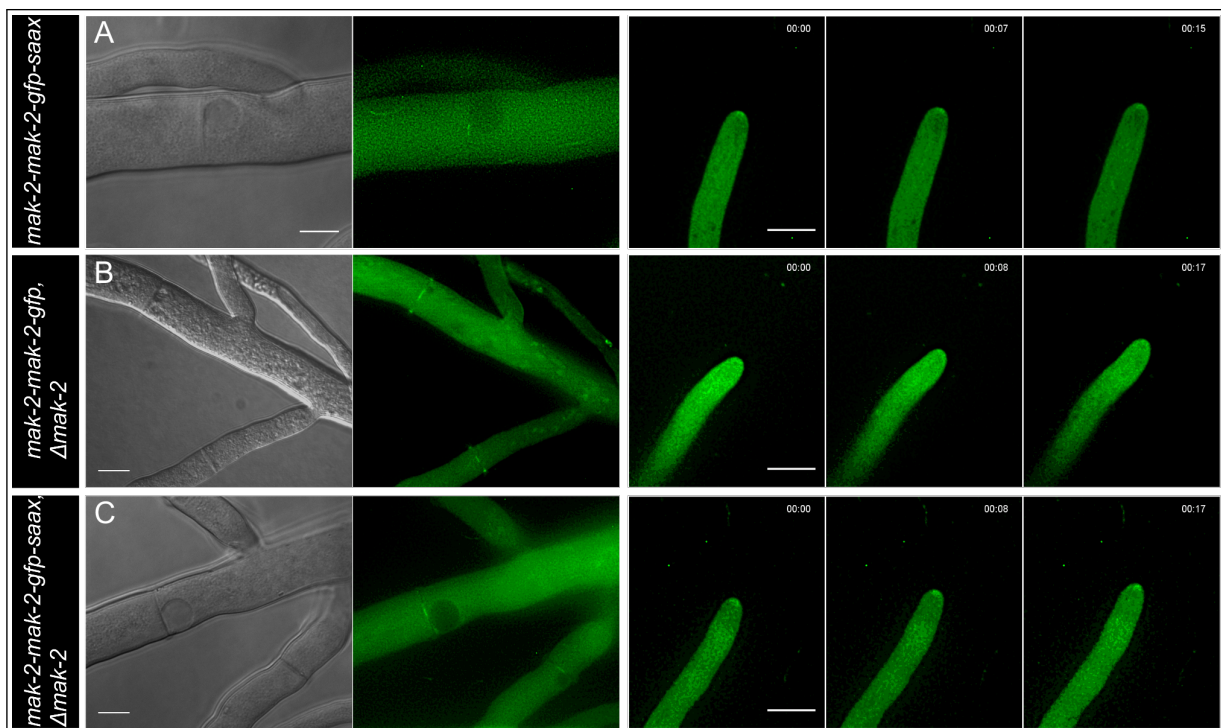


Abbildung 3.20.: Vergleichende Hyphenlokalisierung von MAK-2-GFP- und MAK-2-GFP-SAAX-Fusionsproteinen, die mit Hilfe des nativen *mak-2*-Promotors exprimiert wurden

Unter der Kontrolle des nativen *mak-2*-Promotors exprimiertes MAK-2-GFP-SAAX lokalisiert A) sowohl im Wildtyp-Hintergrund als auch C) im *mak-2*-Deletionshintergrund cytoplasmatisch und in den Zellkernen und akkumuliert an den Septen und den Spitzen wachsender Hyphen. B) Mit Hilfe des nativen Promotors im $\Delta mak-2$ -Hintergrund exprimiertes MAK-2-GFP lokalisiert ebenfalls cytoplasmatisch und an den Septen, konnte aber in dieser Studie nicht an den Spitzen schnell wachsender Hyphen beobachtet werden. Maßstab: 10 μ m.

3.3.3. Die subzelluläre Dynamik von MAK-2 ist essentiell für die Funktion der Kinase

Die zeitlich und räumlich hoch koordinierte Dynamik von MAK-2 in interagierenden Keimlingen deutet auf einen engen Zusammenhang zwischen der subzellulären Dynamik und der Funktion der Kinase während der vegetativen Zell-Zell-Kommunikation hin. Um diesen Zusammenhang genauer zu entschlüsseln, wurde die Dynamik der Kinase durch einen künstlichen Membrananker vollständig unterbrochen [Lemanski, 2010]. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der membrangebundenen Kinasenvariante MAK-2-GFP-CAAX auf die Zell-Zell-Kommunikation untersucht. Um zu testen, ob die subzelluläre Dynamik von MAK-2 essentiell für die Funktion der Kinase ist, wurde *mak-2-gfp-caax* im $\Delta mak-2$ -Hintergrund exprimiert. Da der $\Delta mak-2$ -Stamm einen charakteristischen Phänotyp aufweist, konnte in den erhaltenen Stämmen direkt untersucht werden, ob das eingebrachte *mak-2-gfp-caax*-Konstrukt die Defekte der Deletionsmutante komplementiert. Hierzu wurden vier charakteristische Merkmale untersucht und ihre Ausprägungen in den zu testenden Stämmen mit dem Wildtyp, der *mak-2*-Deletionsmutante und den *saax*-Kontrollstämmen verglichen.

Um *mak-2-gfp-caax* mit dem nativen Promotor im $\Delta mak-2$ -Hintergrund zu exprimieren wurde das Plasmid p21 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*) hergestellt und in den *mak-2*-Deletionsstamm mak6.2.1 ($\Delta mak-2$, *his-3*⁻, *al-1*⁻, *matA*^{Dip?}) transformiert. Da die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der *caax*-exprimierenden Stämme oft schwierig ist, wurde *mak-2-gfp-caax* auch mit Hilfe des starken *tef-1*-Promotors exprimiert (Abschnitt 3.3.1 und [Lemanski, 2010]). Hierfür wurden das Plasmid p27 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) hergestellt und ebenfalls in den *mak-2*-Deletionsstamm mak6.2.1 ($\Delta mak-2$, *his-3*⁻, *al-1*⁻, *matA*^{Dip?}) transformiert. Da es sich bei diesem Stamm um eine Albino-Mutante handelt, die sich durch eine weiße statt orangene Färbung der Sporen auszeichnet, waren die Sporen der erhaltenen Transformanten erwartungsgemäß ebenfalls weiß gefärbt (Abbildung 3.22A). Es wurden Sporen von 9 (nativer Promotor) bzw. 10 (*tef-1*-Promotor) erhaltenen Transformanten auf ihre Fluoreszenz untersucht. Die Stämme MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) mit der jeweils besten Fluoreszenz wurden per PCR auf das Vorhandensein

des *pmak-2-mak-2-gfp-caax* bzw. *ptef-1-mak-2-gfp-caax*-Konstrukts und die Abwesenheit des nativen *mak-2*-Gens überprüft und für weitere Analysen verwendet.

Die *mak-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämme wurden zunächst fluoreszenzmikroskopisch untersucht, um die Membranlokalisation des Fusionsproteins visuell zu bestätigen. Die mikroskopischen Analysen der Stämme MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) sowie der entsprechenden SAAX-Kontrollstämme MT-38-404, MT-38-653 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) und MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) zeigten deutliche Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenzsignale. Dabei wurde wie erwartet eine deutlich geringere Fluoreszenz in den Stämmen beobachtet, die das *mak-2-gfp-c/saax*-Konstrukt unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimieren, gegenüber den Stämmen, die das Konstrukt unter der Kontrolle des *tef-1*-Promotors exprimieren. Der Stamm MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) zeigte also gegenüber dem Stamm MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) ein erheblich stärkeres Fluoreszenzsignal, ebenso wie der Stamm MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) gegenüber den Stämmen MT-38-404 und MT-38-653 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$). Des Weiteren wiesen die Stämme, die MAK-2-GFP-CAAX exprimierten, deutlich schlechtere Fluoreszenzsignale als die SAAX-Kontrollstämme auf (Abbildung 3.21). Diese Beobachtungen deuten erneut auf einen schon zuvor beobachteten schnellen Abbau der CAAX-modifizierten Proteine hin ([Lemanski, 2010] und Abschnitt 3.3.1).

Während der Stamm MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) keine sichtbare Fluoreszenz in Keimlingen aufweist, zeigt der Stamm MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) ein deutliches Fluoreszenzsignal an der gesamten Plasmamembran, wobei das intensivste Signal häufig weitläufig um die Spitze des Keimschlauchs zu beobachten ist (Abbildung 3.21A und C). In nicht interagierenden Keimlingen der Kontrollstämme MT-38-404 und MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) liegt MAK-2-GFP-SAAX wie erwartet cytoplasmatisch vor, wobei das Fluoreszenzsignal in dem Stamm MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) intensiver ist (Abbildung 3.21B und D). In interagierenden Keimlingen der Kontrollstämme wird MAK-2-GFP-SAAX wie zuvor beschrieben oszillierend an die Spitzen interagierender Keimlinge rekrutiert (Abbildung 3.19C und 3.17C).

3. Ergebnisse

In reifen Hyphen des Stammes MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) ist das Fluoreszenzsignal sehr schwach, wobei geringe Fluoreszenzsignale an den Septen beobachtet werden können (Abbildung 3.21E). In reifen Hyphen des Stammes MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) lokalisiert MAK-2-GFP-CAAX hingegen deutlich an der gesamten Membran, wobei an den Septen ein noch stärkeres Signal zu sehen ist (Abbildung 3.21G). Diese Septenlokalisation unterscheidet sich deutlich von der Septenlokalisation von MAK-2-GFP-SAAX in den Stämmen MT-38-653 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) und MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$), in denen MAK-2-GFP-SAAX direkt um die Septenpore herum lokalisiert und nicht an dem gesamten Septum zu sehen ist (Abbildung 3.21F und H). Eine starke Färbung der Septen im Vergleich zur restlichen Plasmamembran wurde in *N. crassa* bereits zuvor mit dem membranfärbendem Farbstoff FM4-64 beobachtet. Es wird vermutet, dass eine Membranfärbung an den Septen besonders intensiv zu sehen ist, da die Plasmamembran durch das Septum eingestülpt wird und daher an dieser Stelle doppelt vorliegt [Fischer-Parton et al., 2000]. Gemeinsam deuten die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen darauf hin, dass MAK-2-GFP-CAAX auch in dem Stamm MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) an der gesamten Plasmamembran lokalisiert, durch die geringe Expression und den schnellen Abbau allerdings nur in so geringen Mengen vorliegt, dass eine Visualisierung mit der vorhandenen Mikroskopie-Ausstattung nicht zufriedenstellend möglich ist. Der Stamm MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$), in dem *mak-2-gfp-caax* mit Hilfe des starken *tef-1*-Promotors exprimiert wird, führt dagegen zu einer deutlichen Lokalisation von MAK-2-GFP-CAAX an der gesamten Plasmamembran. Darüber hinaus lokalisiert MAK-2-GFP-CAAX in diesem Stamm an Strukturen innerhalb der Hyphe, bei denen es sich um Organellen mit Membranen wie z.B. Endosomen handeln könnte [Fischer-Parton et al., 2000]. Im Gegensatz zu MAK-2-GFP-SAAX lokalisiert MAK-2-GFP-CAAX aber weder in Keimlingen noch in reifen Hyphen cytoplasmatisch (Abbildung 3.21). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass MAK-2-GFP-CAAX in Keimlingen und reifen Hyphen erfolgreich an die Plasmamembran rekrutiert und dort mit Hilfe des *tef-1*-Promotors gut visualisiert werden kann. Eine Entlassung der Kinase ins Cytoplasma findet nicht oder nur in geringem Umfang statt, sodass eine dynamische subzelluläre Lokalisation von MAK-2-GFP-CAAX erfolgreich verhindert wird.

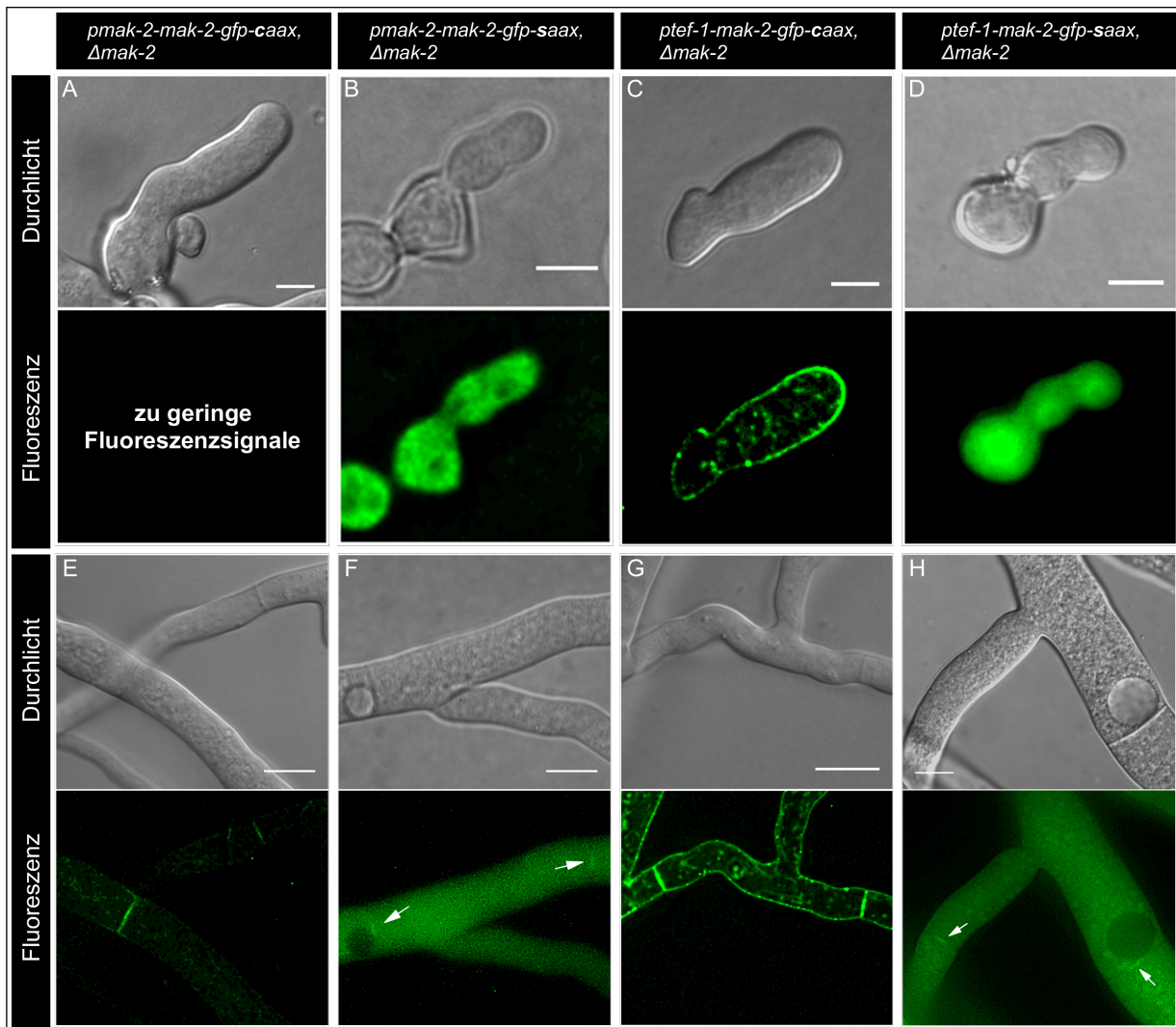


Abbildung 3.21.: Promotorabhängige Lokalisierung von MAK-2-GFP-CAAX und MAK-2-GFP-SAAX in Keimlingen und reifen Hyphen

A) In Keimlingen des Stammes MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax, Δmak-2*) ist eine Lokalisierung von MAK-2-GFP-CAAX auf Grund der zu geringen Fluoreszenzsignale nicht möglich. In Keimlingen des Stammes C) MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax, Δmak-2*) lokalisiert MAK-2-GFP-CAAX deutlich an der Plasmamembran, während B und D) MAK-2-GFP-SAAX in Keimlingen der Kontrollstämmen MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax, Δmak-2*) und MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, Δmak-2*) cytoplasmatisch vorliegt. Maßstab: 5µm. E und G) In Hyphen der Stämme MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax, Δmak-2*) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax, Δmak-2*) lokalisiert MAK-2-GFP-CAAX schwach oder deutlich an der Plasmamembran und in Strukturen innerhalb der Hyphe. F und H) Im Gegensatz dazu lokalisiert MAK-2-GFP-SAAX in den Kontrollstämmen MT-38-653 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax, Δmak-2*) und MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, Δmak-2*) cytoplasmatisch und um die Septenpore herum. Maßstab: 10µm.

Nachdem mikroskopisch bestätigt wurde, dass MAK-2-GFP-CAAX permanent an der Plasmamembran lokalisiert, sollte untersucht werden, ob diese membranassoziierte Kinasevariante die Funktion der nativen Kinase übernehmen kann. Die *mak-2*-Deletionsmutante weist einen pleiotropen Phänotyp auf, der sich makroskopisch unter anderem durch geringes Wachstum, eine reduzierte Bildung von Lufthyphen und ein verändertes Sporulationsmuster auszeichnet. Auf mikroskopischer Ebene findet in der Deletionsmutante kein gerichtetes Wachstum von Keimlingen und keine Zellfusion statt [Pandey et al., 2004]. Um zu untersuchen, ob die subzelluläre Dynamik von MAK-2 essentiell für die Funktion der Kinase ist, wurden die Stämmen MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) in dieser Arbeit auf ihren makroskopischen und mikroskopischen Phänotyp untersucht. Diese Stämme enthalten kein natives MAK-2, sondern nur die in ihrer subzellulären Dynamik eingeschränkte Kinasenvariante MAK-2-GFP-CAAX, die über einen Farnesylanker dauerhaft an die Membranen rekrutiert wird (Abbildung 3.21C und G). Es wurde erwartet, dass der Phänotyp des Wildtyps in den Stämmen MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) ganz oder teilweise wieder hergestellt wird, wenn die Kinase ihre Funktion auch ohne die subzelluläre Dynamik ganz oder teilweise ausüben kann. Wenn die Dynamik dagegen essentiell für die Funktion von MAK-2 ist, wurde erwartet, dass der Phänotyp der untersuchten Stämme dem Phänotyp der *mak-2*-Deletionsmutante entspricht. Es wurden daher die auffälligen und gut messbaren Merkmale lineares Wachstums, Sporenbildung, Bildung von Lufthyphen und der Fähigkeit der Keimlinge miteinander zu interagieren in den Stämmen MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) untersucht und mit dem Wildtyp N1-01, der *mak-2*-Deletionsmutante KO-0142 ($\Delta mak-2$) und den *saax*-Kontrollstämmen MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) und MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) verglichen.

Makroskopisch weisen die Stämme MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) einen flachen Phänotyp auf, und ähneln daher optisch stark der *mak-2*-Deletionsmutante, während die *saax*-Kontrollstämmen ebenso wie der Stamm N1-01 (*wt*) ein typisches Luftmyzel mit Konidien ausbilden (Abbildung 3.22A).

Messungen des Längenwachstums zeigten, dass die Stämme N1-01 (*wt*), MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) und MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) mit einem täglichen Längenwachstum von durchschnittlich 6,6 ($\pm 0,6$) cm (N1-01, *wt*) bis 7,1 ($\pm 0,5$) cm (MT-39-381, *ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) fast dreimal so schnell wachsen wie der Stamm KO-0142 ($\Delta mak-2$) mit einem durchschnittlichen Wachstum von 2,3 ($\pm 0,1$) cm/Tag, und etwa doppelt so schnell wie die Stämme MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) mit einem durchschnittlichen Wachstum von 2,8 ($\pm 0,1$) cm/Tag bzw. 3,4 ($\pm 0,4$) cm/Tag (Abbildung 3.22B). Eine statistische Auswertung der Messdaten zeigte, dass die Wachstumsraten des Wildtyps N1-01 und der *saax*-Kontrollstämmen nicht signifikant voneinander abweichen. Die Wachstumsrate der *caax*-Stämme und der *mak-2*-Deletionsmutante ist dagegen im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert ($p \leq 0,001$). Im Gegensatz zu der $\Delta mak-2$ -Mutante ist das Wachstum der *caax*-Stämme signifikant erhöht ($p \leq 0,001$), wobei der Stamm MT-22-640 schneller wächst als der Stamm MT-21-643 ($p \leq 0,01$). Diese Ergebnisse zeigen, dass *mak-2-gfp-caax* den Wachstumsdefekt des $\Delta mak-2$ -Stamms partiell komplementiert, wobei eine Überexpression von *mak-2-gfp-caax* diesen Effekt verstärkt.

Messungen der Längen von Lufthyphen und eine statistische Auswertung der Daten zeigten, dass das durchschnittliche Wachstum der Lufthyphen in den *saax*-Kontrollstämmen mit etwa 18,9 ($\pm 1,6$) mm/Tag (MT-38-381) bzw. 19,2 ($\pm 2,1$) mm/Tag (MT-39-361) vergleichbar mit dem Wachstum der Lufthyphen im Wildtyp N1-01 mit durchschnittlich etwa 17,6 ($\pm 1,3$) mm/Tag ist. Das Lufthyphenwachstum der *caax*-Stämme ist dagegen mit durchschnittlich 4,8 ($\pm 0,9$) mm/Tag (MT-21-643) bzw. 4,9 ($\pm 0,7$) mm/Tag (MT-22-640) im Vergleich zum Wildtyp um etwa 70 % reduziert ($p \leq 0,001$), und zeigt keine signifikanten Wachstumsunterschiede zu der $\Delta mak-2$ -Mutante, deren Lufthyphen sich im Durchschnitt um etwa 3,8 ($\pm 0,8$) mm/Tag verlängern (Abbildung 3.22C).

Die Quantifizierung und statistische Auswertung der Sporenbildung der Test- und Kontrollstämmen zeigten ein vergleichbares Muster. Die *saax*-Stämme MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) und MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) bildeten mit durchschnittlich $26,1 (\pm 2,5) \cdot 10^7$ bzw. $25,4 (\pm 1,1) \cdot 10^7$ Sporen pro Kulturröhrchen etwa so viele Sporen wie der Wildtyp mit durchschnittlich $27,9 (\pm 4,2) \cdot 10^7$ Sporen pro Kulturröhrchen. Die

3. Ergebnisse

caax-Stämme MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) bildeten hingegen mit etwa $2,6 (\pm 0,3) \cdot 10^7$ bzw. $2,3 (\pm 0,3) \cdot 10^7$ weniger als 10 % der Sporen im Wildtyp ($p \leq 0,001$), aber vergleichbar viele Sporen wie die *mak-2*-Deletionsmutante KO-0142 mit durchschnittlich $2,6 (\pm 0,2) \cdot 10^7$ Konidien pro Kulturröhrchen (Abbildung 3.22D).

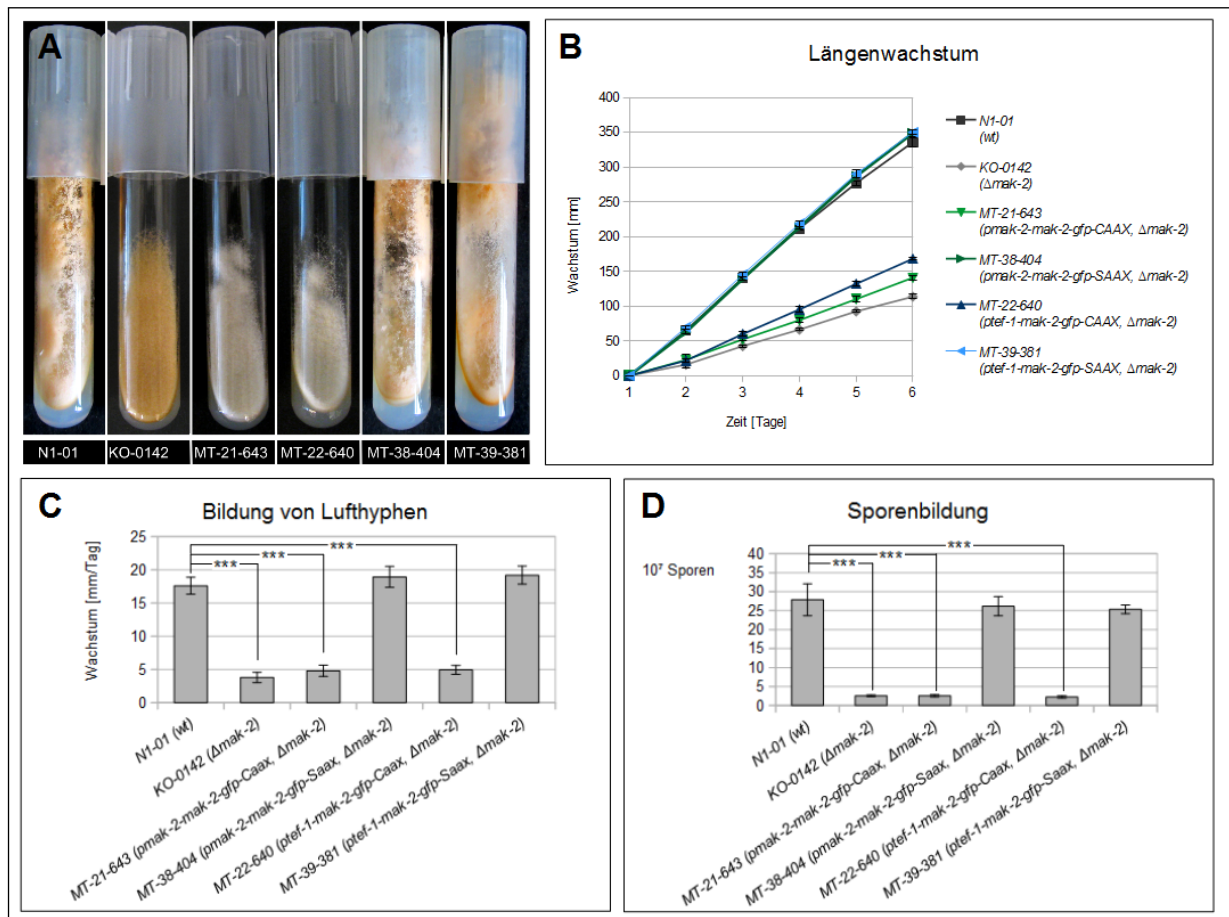


Abbildung 3.22.: Quantifizierung makroskopischer Merkmale der Stämme MT-21-643 und MT-22-640

A) Makroskopischer Phänotyp untersuchten Stämme auf Röhren mit Minimalmedium nach 7 Tagen Wachstum. B) Quantifizierung des Längenwachstums, C) der Bildung von Lufthyphen und D) der Menge gebildeter Sporen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen aus je 5 bis 6 unabhängig voneinander wiederholten Experimenten.

Die ermittelten makroskopischen Wachstumsdefekte der Stämme MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) bzw. MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) deuten bereits darauf hin, dass *mak-2-gfp-caax* auch den interessantesten Phänotyp der Deletionsmutante, den Fusionsphänotyp, nicht komplementiert. Diese Vermutung wurde durch mikroskopische Analysen

bestätigt. Während Keimlinge des Wildtyps und der *saax*-Kontrollstämme ihre Wachstumsrichtung gezielt ändern und aufeinander zuwachsen (Abbildung 3.23B und C jeweils linke Spalte), gehen Keimlinge der Stämme MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) ebenso wie die *mak-2*-Deletionsmutante KO-0142 praktisch keine Keimlingsinteraktionen ein (Abbildung 3.23B und C jeweils rechte Spalte). Liegen zwei oder mehr Keimlinge in räumlicher Nähe zueinander, sind sie nicht in der Lage ihre Wachstumsrichtung aufeinander abzustimmen, und wachsen gerade weiter.

Um die Keimlingsinteraktionen genau zu quantifizieren wurden Keimlingsassays durchgeführt und interagierende und nicht-interagierende Keimlinge nach 4 und nach 6 Stunden Inkubationszeit gezählt und anschließend der prozentuale Anteil interagierender Keimlinge bestimmt (Abbildung 3.23A). Diese Quantifizierungen bestätigen, dass sich nach 6 Stunden Inkubationszeit unter 2 % der Keimlinge der Stämmen MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) in einer Interaktion befinden und sich somit statistisch nicht von den Keimlingen des Stammes KO-0142 ($\Delta mak-2$) unterscheiden, von denen sich nach 6 Stunden Inkubationszeit 2,3 ($\pm 2,1$)% in einer Interaktion befinden. Im Gegensatz dazu interagieren zu diesem Zeitpunkt etwa 94,1 ($\pm 4,3$)% der Keimlinge des Kontrollstamms MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) und unterscheiden sich somit aus statistischer Sicht nicht von Keimlingen des Wildtyps. Im Gegensatz dazu zeigen Keimlinge des *saax*-Kontrollstamms MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) nach 6 Stunden Inkubationszeit mit 71,5 ($\pm 15,2$)% interagierenden Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion der Interaktionen um 27 % ($p \leq 0,05$) (Abschnitt 3.3.2). Interessanterweise zeigen die statistischen Analysen außerdem, dass sich der Anteil interagierender Keimlinge innerhalb eines Stammes in der Regel nach 4 Stunden im Vergleich zu 6 Stunden Inkubationszeit nicht mehr signifikant erhöht. Lediglich die Interaktionsrate des Stammes MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) zeigten nach 6 Stunden Inkubationszeit einen Anstieg der Interaktionsrate um etwa 13 % im Vergleich mit der Interaktionsrate nach 4 Stunden Inkubationszeit ($p \leq 0,05$).

Die Ergebnisse der Komplementationsversuche zeigen, dass das für die membrangebundene Kinasevariante kodierende Konstrukt *mak-2-gfp-caax* die Defekte der Δmak -Mutante nicht komplementiert. Lediglich das Längenwachstum der *caax*-Stämme MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) ist im Vergleich

3. Ergebnisse

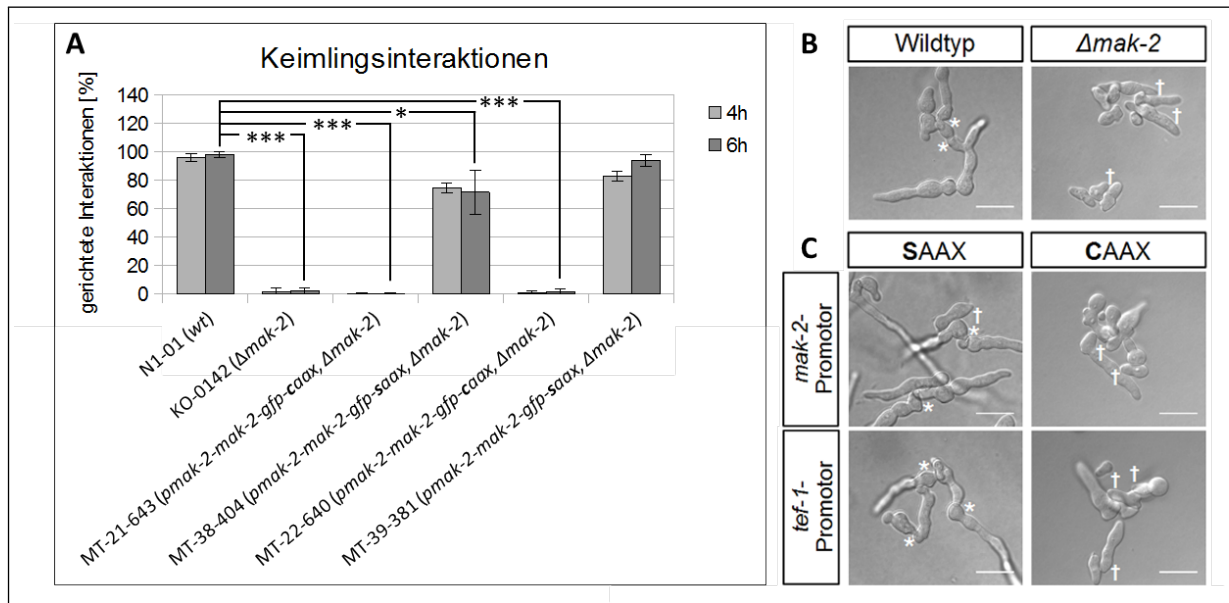


Abbildung 3.23.: Quantifizierung von Keimlingsinteraktionen in den Stämmen MT-21-643 und MT-22-640

A) Quantifizierungen von Keimlingsinteraktionen der Stämme N1-01 (Wildtyp), KO-0142 ($\Delta mak-2$), MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$), MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$), MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) nach 4 und 6 Stunden Inkubationszeit. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen aus 5 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. B) Exemplarische Ausschnitte von Keimlingen des Stammes N1-01 (Wildtyp) und KO-0142 ($\Delta mak-2$) und C) der Test- und Kontrollstämme MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$), MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$), MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) nach 6 Stunden Inkubationszeit auf Minimalmedium. Weiße Sternchen markieren Zell-Zell-Interaktionen und weiße Kreuze geben Keimlinge an, die trotz räumlicher Nähe zueinander kein gerichtetes Wachstum aufweisen. Maßstab: 25 μ m.

zu dem Längenwachstum der $\Delta mak-2$ -Mutante leicht erhöht. Interessanterweise wird dieser Effekt durch die Überexpression von *mak-2-gfp-caax* in dem Stamm MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) verstärkt. In allen anderen untersuchten Merkmalen unterschieden sich die Stämme MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) nicht von der *mak-2*-Deletionsmutante KO-0142. Die *saax*-Kontrollstämme verhielten sich dagegen in fast allen untersuchten Merkmalen wie der Wildtyp und zeigen damit deutlich, dass der Funktionsverlust von MAK-2-GFP-CAAX auf die Misslokalisierung der Kinase zurückzuführen ist und nicht auf unbeabsichtigten Artefakten beruht. Lediglich die Keimlingsinteraktionen sind in den *saax*-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert. Die Expression von *mak-2-gfp-saax* mit Hilfe des nativen Promotors führt in dem Stamm MT-38-404 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) nur zu einer partiellen Komplementation der Keimlingsinteraktionen. Die Überexpression von *mak-2-gfp-saax* führt dagegen in dem Stamm MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) zu einer etwas verzögerten Entwicklung in der sehr frühen Entwicklungsphase der Keimlingen (Keimlingsinteraktionen nach 4 Stunden Inkubationszeit), komplementiert aber alle untersuchten Merkmale der späteren Entwicklungsphasen vollständig. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass die dynamische Lokalisierung von MAK-2 essentiell für die Funktion der Kinase während der Keimlingsfusion und anderen vegetativen Entwicklungsprozessen ist.

3.3.4. Membrangebundenes MAK-2 hat einen dominant negativen Effekt im Wildtyp-Hintergrund

MAK-2-GFP lokalisiert in nicht-interagierenden Keimlingen und Hyphen cytoplasmatisch und wird in interagierenden Keimlingen oszillierend an die Plasmamembran rekrutiert (Abschnitt 3.1.1 und 3.2.1). Aufgrund dieser ungewöhnlichen subzellulären Lokalisation wurde eine besondere Bedeutung dieser Dynamik für die Funktion der Kinase vermutet und in dieser Arbeit gezeigt, dass die subzelluläre Dynamik von MAK-2 essentiell für die Funktion der Kinase ist (Abschnitt 3.3.3). Stämme, die ausschließlich eine membrangebundene Variante der Kinase exprimieren, gehen wie der $\Delta mak-2$ -Stamm keine Keimlingsinteraktionen ein und zeigen weitere vergleichbare Entwicklungsdefekte. Diese Ergebnisse heben hervor, dass nicht nur die

Assoziation von MAK-2 mit der Plasmamembran, sondern auch die Dissoziation von der Membran eine zentrale Rolle für die Funktion der Kinase spielen. Ein Gegenspieler von MAK-2 ist das Protein SO, das ebenso wie MAK-2 essentiell für den Aufbau von Keimlingsinteraktionen ist. Die molekulare Funktion von SO ist bisher unbekannt, in interagierenden Keimlingen weist das Protein aber eine zu MAK-2 komplementäre oszillierende Rekrutierung an die Plasmamembran auf. Dabei ist auffällig, dass MAK-2 und SO zu keinem Zeitpunkt der Interaktion bis zur Herstellung eines Zellkontaktes gleichzeitig an der Membran eines Keimlings lokalisieren. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, in dem die Zellen schnell zwischen zwei physiologischen Zuständen umschalten, die durch die Anwesenheit von MAK-2 oder SO an der Plasmamembran gekennzeichnet sind. Diese beiden Zustände wurden mit dem Senden (SO) und Empfangen eines chemotropen Signals (MAK-2) der Partnerzelle in Verbindung gebracht [Fleissner et al., 2009]. Ohne einen genauen Mechanismus postulieren zu können, wurde in dieser Arbeit vermutet, dass eine permanente Lokalisation von MAK-2 an der Plasmamembran Faktoren beeinflussen könnte, die für den dynamischen Wechsel von dem Signal-Empfangenden in den Signal-Sendenden Zustand eine wichtige Rolle spielen. Mögliche Folgen könnten beispielsweise eine Veränderung in der dynamischen Lokalisation, und damit einhergehend, der Funktion von SO sein.

Um diese Vermutungen genauer zu untersuchen wurde *mak-2-gfp-caax* im Wildtyp-Hintergrund exprimiert. Die resultierenden Stämme enthalten sowohl das frei bewegliche, native MAK-2, als auch die künstlich membrangebundene Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die vorhandene native Kinase ihre Funktion erfüllen kann, sodass die erhaltenen Stämme Keimlingsinteraktionen aufweisen und sich wie der Wildtyp entwickeln. Wenn die permanente Membranassoziation von MAK-2-GFP-CAAX einen Einfluss auf SO, weitere an der Kommunikation zwischen Keimlingen beteiligten Proteine (inklusive der nativen MAK-2 Kinase) oder sonstiger Faktoren hat, wurde eine Reduktion oder ein völliger Abbruch der Keimlingsinteraktionen erwartet, die möglicherweise mit weiteren Entwicklungsdefiziten einhergehen könnten. Die erhaltenen Stämme wurden daher auf ihre vegetativen Merkmale Längenwachstum, Bildung von Sporen und Lufthyphen und die Keimlingsinteraktionen untersucht und mit dem Wildtyp-Stamm N1-01 verglichen. Die beschriebenen Merkmale wurden in dem Stamm MT-17-353 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, Herstellung Abschnitt 3.3.1) und dem ent-

sprechenden Kontrollstamm MT-27-358 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*, Herstellung Abschnitt 3.3.2) untersucht. Da vieles auf einen schnellen Abbau von MAK-2-GFP-CAAX in Keimlingen hinweist (Abschnitt 3.3.1 und 3.3.5), wurden die Stämme MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, Herstellung Abschnitt 3.3.1) und MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, matA*; Herstellung Abschnitt 3.3.2), die *mak-2-gfp-c/saax* mit Hilfe des starken *tef-1*-Promotors überexprimieren, ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen. Falls die permanente Membranlokalisation von MAK-2 einen Einfluss auf Keimlingsinteraktionen oder die allgemeine vegetative Entwicklung der Stämme haben sollte, wurde eine Verstärkung dieser Effekte durch eine Überexpression von *mak-2-gfp-caax* erwartet.

Die Inkubation der untersuchten Stämme in Röhrchen zeigte keine offensichtlichen Entwicklungsunterschiede zwischen den Stämmen (Abbildung 3.24A). Erst genauere Untersuchungen des Längenwachstums zeigten, dass der Stamm MT-19-378, in dem die membrangebundene MAK-2-Kinase überexprimiert wird, leichte Wachstumsdefizite im Vergleich zum Wildtyp N1-01 aufweist ($p \leq 0,01$). Während der Wildtyp im Durchschnitt $6,4 (\pm 0,4)$ cm pro Tag wächst, ist die Wachstumsrate in dem Stamm MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) mit einem durchschnittlichen Wachstum von $5,3 (\pm 0,2)$ cm pro Tag im Vergleich zum Wildtyp um fast 20 % reduziert. Im Gegensatz dazu zeigte der Stamm MT-17-353, in dem *mak-2-gfp-caax* mit Hilfe des nativen Promotors exprimiert wird, mit einem durchschnittlichen Wachstum von $5,7 (\pm 0,3)$ cm pro Tag keine signifikanten Änderung im Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp. Auch die *saax*-Kontrollstämme MT-27-358 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*) und MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, matA*) zeigten mit einem durchschnittlichen Wachstum von $6,3 (\pm 0,2)$ und $6,6 (\pm 0,5)$ cm pro Tag wie erwartet keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp (3.24B).

Die Länge der gebildeten Lufthyphen lag in allen untersuchten Stämmen zwischen durchschnittlich $11,4 (\pm 1,1)$ mm (MT-17-353) und $12,5 (\pm 1,4)$ mm (N1-01) pro Tag, wobei in keinem der Stämme ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp beobachtet wurde (3.24C). Auch bei der Bildung von Konidien wurde mit durchschnittlich von $21,3 (\pm 4,4) \cdot 10^7$ (N1-01) bis zu $28,3 (\pm 7,7) \cdot 10^7$ (MT-17-353) Konidien pro Röhrchen kein signifikanter Unterschied der untersuchten Stämme zum Wildtyp beobachtet (3.24D). Insgesamt zeigen die Stämme MT-17-353 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*) und MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) ein sehr ähnliches Verhalten wie der Wildtyp. Lediglich die Wachstumsrate des Stammes MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-*

3. Ergebnisse

gfp-caax) ist im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert. Es wurde bereits zuvor beobachtet, dass einige partielle Fusionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp reduziertes Längenwachstum aufweisen [Dettmann et al., 2013], was ein Hinweis darauf sein könnte, dass auch die Keimlinge des Stammes MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) reduzierte Interaktionen aufweisen könnten.

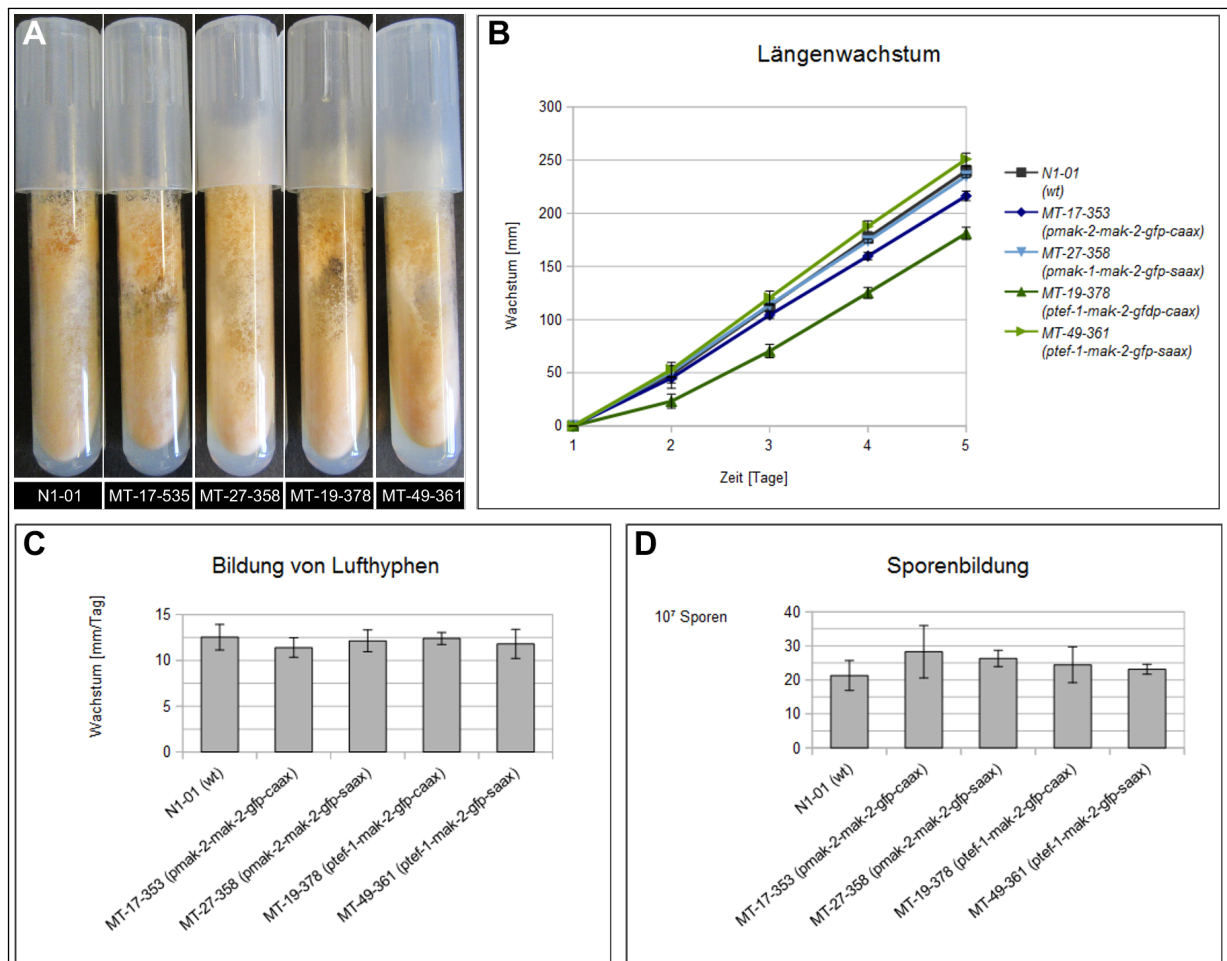


Abbildung 3.24.: Quantifizierung von makroskopischen Merkmalen der Stämme MT-17-353 und MT-19-378

A) In Kulturröhrchen wachsende Stämme MT-17-353 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*) und MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) unterscheiden sich ebenso wie die Kontrollstämme MT-27-358 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*) und MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*) makroskopisch nicht vom Wildtyp N1-01. Quantifizierungen der untersuchten Merkmale B) lineares Wachstum, C) Bildung von Lufthyphen und D) der Menge gebildeter Sporen zeigen keine Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen. Alle Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen aus 5 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Um die Anzahl der Keimlingsinteraktionen zu quantifizieren wurden interagierende und nicht-interagierende Keimlinge der untersuchten Stämme in Keimlingsassays nach 4 und nach 6

Stunden ausgezählt (Abbildung 3.25A). Statistische Analysen der Daten zeigten, dass die meisten Keimlinge sich nach 4 Stunden bereits in Interaktionen befanden, und die jeweiligen Werte sich nach 6 Stunden nicht mehr signifikant veränderten. Die Quantifizierung interagierender Keimlinge des Stammes MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) zeigte, dass die Anzahl vorhandener Interaktionen im Vergleich zum Wildtyp um etwa 20 % reduziert sind. Während sich nach 6 Stunden Inkubationszeit im Wildtyp-Stamm N1-01 etwa 90 (± 2) % der Keimlinge in einer gerichteten Interaktion befinden, zeigen in dem Stamm MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) nur etwa 71 (± 8) % der Keimlinge gerichtetes Wachstum zu einem Interaktionspartner. Die Stämme MT-17-353 und MT-27-358, in denen *mak-2-gfp-caax* bzw. *mak-2-gfp-saax* unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wird, zeigen dagegen keinerlei Einschränkungen in ihren gerichteten Interaktionen. Der Stamm MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, matA*) zeigt mit 84% interagierenden Keimlingen nach 4 Stunden Inkubationszeit im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion der Interaktionen um etwa 11%. Nach 6 Stunden Inkubationszeit ist kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp mehr feststellbar, was zusammen mit der mit dem Wildtyp vergleichbaren Entwicklung aller betrachteten Merkmale darauf hindeutet, dass MAK-2-GFP-SAAX keinen biologisch signifikanten Einfluss auf die Keimlingsinteraktionen und allgemeine vegetative Entwicklung ausübt.

Während der Mikroskopie für die Quantifizierung der Keimlingsinteraktionen wurde bereits deutlich, dass Keimlinge des Stammes MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) neben der quantitativen Reduktion auch eine qualitative Veränderung der Interaktionen zeigen. Im Wildtyp passen interagierende Keimlinge ihre Wachstumsrichtung aneinander an und berühren sich schließlich mit einem Spitze-zu-Spitze-Kontakt (Abbildung 3.25D, linkes Bild). Direkt nach der Berührung wird das Wachstum eingestellt und die Zellen für die Fusion vorbereitet [Leeder et al., 2011]. In dem Stamm MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) wurden zusätzlich zu den beschriebenen Berührungspunkten auch immer wieder auffällige Zellkontakte beobachtet, bei denen die betroffenen Keimlinge ihr Wachstum nach der Berührung nicht einstellen. Die Keimschläuche wachsen aneinander weiter, wobei sie sich teilweise umeinander drehen (Abbildung 3.25D, mittleres und rechtes Bild). Ein ähnlicher Phänotyp wurde in *N. crassa* für die Ergosterol-Mutante $\Delta erg-2$ beschrieben. Der für diese Mutante charakteristische Phänotyp sich umeinanderwickelnder Keimlinge wurde als *twisted phenotype* bezeichnet, weshalb diese Bezeichnung

für sich verdrehende Keimlinge des Stammes MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten übernommen wurde [Weichert et al., 2016]. Um die Defekte des Stammes MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) während der Keimlingsinteraktion genauer zu beschreiben wurde der Anteil interagierender Keimlinge bestimmt, der den *twisted phenotype* aufweist. Die Quantifizierung zeigte, dass nach 4 bzw. 6 Stunden Inkubationszeit etwa 22 bzw. 45 % der Keimlinge den *twisted phenotype* aufweisen. Die Erhöhung dieses Wertes nach einer längeren Inkubationszeit ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Phänotyp bei längeren Keimschläuchen einfacher erkannt wird. Im Gegensatz dazu weisen Keimlinge des Wildtyps, des Stammes MT-17-353 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*) und der *saax*-Kontrollstämme nach 4 und 6 Stunden Inkubationszeit ähnliche Anteile des *twisted phenotype* im Bereich von etwa 3 bis 6 % auf (3.25B und C).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Überexpression von *mak-2-gfp-caax* im Wildtyp-Hintergrund einen dominant negativen Effekt auf Quantität und Qualität der Keimlingsinteraktionen ausübt und zu einer Reduktion des vegetatives Längenwachstum führt. Dieser Effekt hängt mit der Menge der an der Membran gebundenen Kinase ab, da dieser Effekt nicht in Stämmen auftritt, die *mak-2-gfp-caax* mit Hilfe des schwächeren nativen Promotors exprimieren. In fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurde MAK-2-GFP-CAAX an den Membranen von Keimlingen der untersuchten Stämme visualisiert, und die unterschiedlichen Mengen des Fusionsproteins bestätigt (Abbildung 3.14A und D). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die Dissoziation von MAK-2 von der Plasmamembran eine wichtige Rolle für die Regulation oder Interaktion mit anderen an der Zellkommunikation beteiligten Faktoren spielt.

3.3.5. Membranverankerung führt zu einer Hyperphosphorylierung von MAK-2-GFP-CAAX

Die subzelluläre Dynamik von MAK-2 ist in interagierenden Keimlingen essentiell für die Funktion der Kinase. Eine künstlich an die Plasmamembran dirigierte und auf dieses Kompartiment beschränkte Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX kann die Funktion der nativen Kinase im Deletionshintergrund nicht übernehmen und führt bei Überexpression im Wildtyp-Hintergrund zu

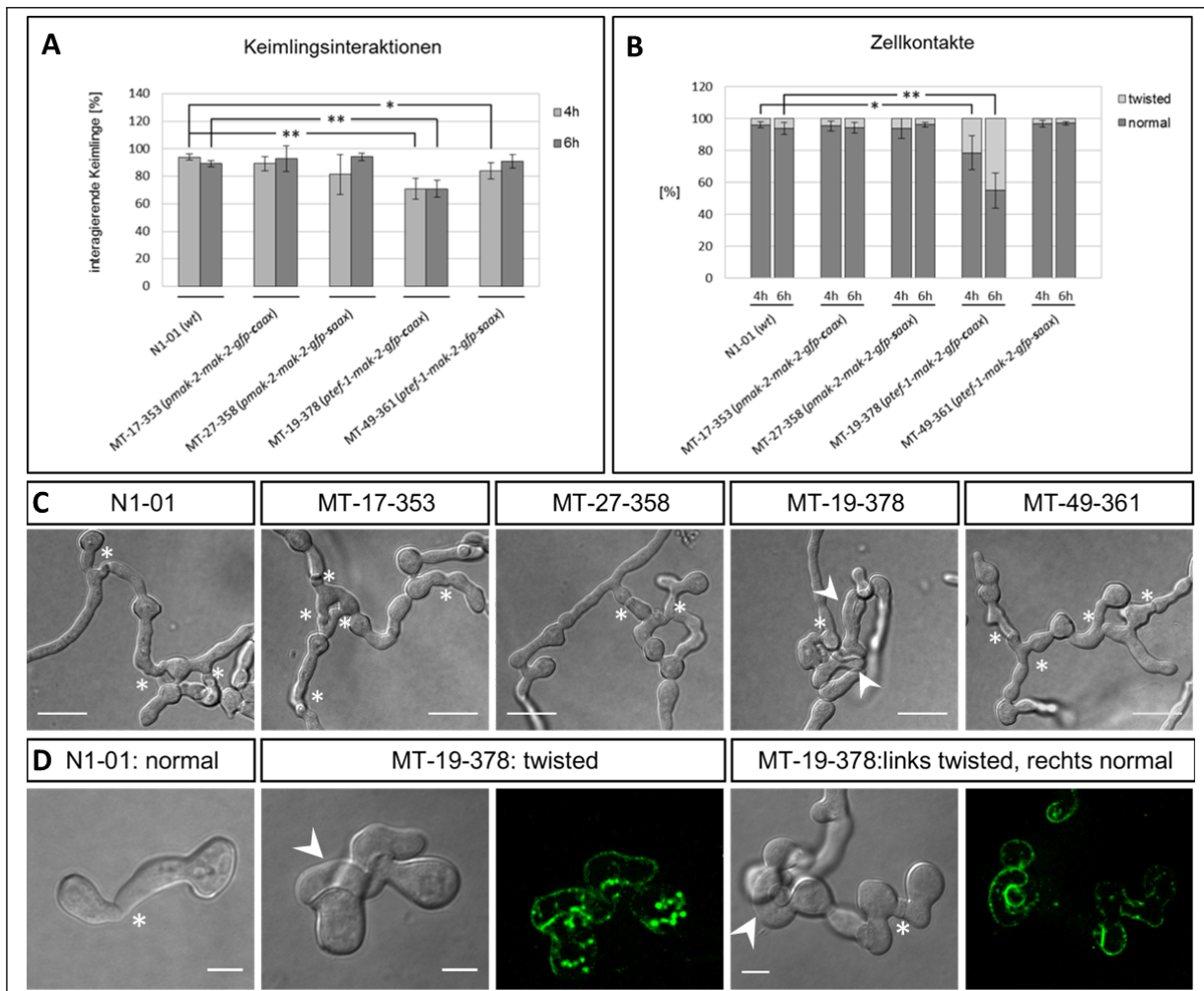


Abbildung 3.25.: Quantifizierung der Keimlingsinteraktionen und untypischen Zellkontakte in den Stämmen MT-17-353 und MT-19-378

Quantifizierungen der Keimlingsinteraktionen (A) und dem Auftreten des *twisted phenotype* an den Kontaktstellen sich berührender Keimlinge (B) in den Stämmen N1-01 (Wildtyp), MT-17-353 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*), MT-27-371 (*pmak-2-mak-2-gfp-saax*), MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) und MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*) nach 4 und nach 6 Stunden Inkubationszeit auf Minimalmedium. Alle Fehlerbalken geben die Standardabweichungen aus 4-5 unabhängigen Experimenten an, in denen jeweils zwischen 104 bis 149 (A) bzw. 72 bis 138 Keimlinge (B) gezählt wurden. C) Exemplarische Ausschnitte der Durchlicht-Mikroskopie zeigen interagierende Keimlinge der untersuchten Stämme nach 6 Stunden Inkubationszeit. Gewöhnliche Zellkontakte sind mit einem Sternchen gekennzeichnet, während Zellkontakte die den *twisted phenotype* aufweisen mit Pfeilspitzen markiert sind. Maßstab: 25µm. D) Links: typischer Zellkontakt zwischen zwei Keimlingen des Wildtyp-Stamms N1-01 (Sternchen). Mitte: zwei Keimlinge des Stammes MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) berühren sich, wachsen aber aneinander weiter (Pfeilspitze), wodurch es zu dem *twisted phenotype* kommt. Rechts: Mehrere Keimlinge des Stammes MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) initiieren durch Keimlingsinteraktionen ein Netzwerk, wobei rechts ein typischer Zellkontakt entstanden ist (Sternchen), während links zwei Keimlinge umeinanderwachsen (Pfeilspitze). Maßstab: 5µm.

einer Reduktion der Keimlingsinteraktionen und veränderten Zellkontakten. Diese Ergebnisse betonen, wie wichtig es für die Zelle ist, die subzelluläre Lokalisation von MAK-2 fein zu regulieren, und heben den engen Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Funktion der Kinase hervor. Die Funktion von MAP-Kinasen besteht in der Regel darin, durch die Phosphorylierung von Zielproteinen eine Zellantwort auszulösen. Damit die MAP-Kinasen ihre Zielproteine phosphorylieren können, müssen sie zuvor selbst durch eine Phosphorylierung durch die MAP Kinase Kinase des MAP-Kinasen-Moduls aktiviert werden. Es besteht also bei MAP-Kinasen auch ein enger Zusammenhang zwischen der Funktion und der Aktivität der Kinasen. Um einen Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Lokalisierung genauer zu untersuchen, wurde in dieser Studie der Aktivierungsstatus der misslokalisierten Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX untersucht. Da diese membranverankerte Kinasevariante nicht funktional ist, wurde vermutet, dass die Restriktion an der Plasmamembran eine Phosphorylierung der Kinase und somit ihre Aktivierung durch die räumliche Trennung von der cytoplasmatischen MAPKK MEK-2 (Abschnitt 3.2.2) verhindern könnte. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Phosphorylierungsstatus von MAK-2-GFP-CAAX in einem Immunoblot ermittelt (Abbildung 3.26). Als Probe dienten Gesamtproteinextrakte der Test- und Kontrollstämme, die aus reifen Hyphen in Schüttelkulturen extrahiert wurden, also unter Bedingungen, in denen wenig Zellinteraktionen stattfinden. Aktiviertes MAK-2 oder MAK-2-GFP-CAAX wurde anschließend über die Reaktion mit einem Anti-Phospho-Antikörper detektiert, der spezifisch phosphoryliertes, aber nicht unphosphoryliertes MAK-2 oder MAK-2-GFP-S/CAAX erkennt. Zur Kontrolle wurde dieselbe Membran nach dem Abwaschen der jeweiligen Antikörper mit anti-GFP- und anti-Tubulin-Antikörpern behandelt. Der anti-GFP-Antikörper detektiert dabei sowohl phosphoryliertes als auch nicht-phosphoryliertes MAK-2-GFP und MAK-2-GFP-SAAX und dient somit dazu die Gesamtmenge der entsprechenden GFP-Fusionsproteine in den Teststämmen zu vergleichen. Tubulin gilt als Haushaltsprotein und dient dazu abzuschätzen, ob in allen Spuren vergleichbare Mengen Gesamtproteinextrakt eingesetzt wurden.

Als Teststämme wurden die Stämme MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) und MT-22-640 eingesetzt, die *mak-2-gfp-caax* unter der Kontrolle des *tef-1*-Promotors im Wildtyp- und im *mak-2*-Deletions-Hintergrund exprimieren. Als Kontrollstämme dienten außer dem Wildtyp N1-01 noch die *saax*-Kontrollstämme MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax, matA*) und MT-39-381 (*ptef-1-*

mak-2-gfp-saax, $\Delta mak-2$). Die Reaktion mit dem anti-Phospho-Antikörper zeigte entgegen unseren Erwartungen, dass MAK-GFP-CAAX sowohl im Wildtyp- (Spur 2) als auch *mak-2*-Deletions-Hintergrund (Spur 4) verglichen mit MAK-2-GFP-SAAX in den jeweiligen *saax*-Kontrollstämmen (Spuren 3 und 5) hyperphosphoryliert vorliegt. Gleichzeitig zeigt die Reaktion mit dem anti-GFP-Antikörper, in der sowohl phosphoryliertes als auch nicht-phosphoryliertes MAK-2-GFP-CAAX bzw. MAK-2-GFP-SAAX detektiert werden, dass MAK-2-GFP-CAAX (Spuren 2 und 4) in viel geringeren Mengen vorhanden ist als MAK-2-GFP-SAAX (Spuren 3 und 5). Dies bestätigt unsere vorherigen Beobachtungen, dass MAK-2-GFP-SAAX in der Zelle schnell abgebaut wird. Setzt man den Phosphorylierungsstatus der MAK-2-Fusionsproteine in Relation zu der Vorhanden Menge der Proteine, so wird die Hyperphosphorylierung von MAK-2-GFP-CAAX im Vergleich zu MAK-2-GFP-SAAX noch deutlicher. Der Wildtyp-Stamm N1-01 weist kein MAK-2-GFP-C/SAAX-Fusionsprotein auf und zeigt entsprechend auch weder mit dem anti-Phospho-Antikörper, noch mit dem anti-GFP-Antikörper Banden für das Fusionsprotein (Spur 1). In der anti-Phospho-Reaktion werden im Wildtyp dagegen aktiviertes natives MAK-2 und die MAP-Kinase MAK-1 detektiert (Spur 1). Eine Bande der nativen MAK-2-Kinase taucht außerdem in den Stämmen MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) und MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, *matA*) auf, wobei die Intensität dieser Bande sehr variabel ist und schwächer oder genauso stark wie im Wildtyp ausfallen kann (Spuren 2 und 3). Die Stämme MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$), die MAK-2-GFP-CAAX bzw. SAAX im $\Delta mak-2$ -Hintergrund exprimieren, weisen erwartungsgemäß keine native MAK-2-Bande auf (Spuren 4 und 5).

Die unerwartete Beobachtung, dass nicht funktionales MAK-2-GFP-CAAX an der Membran hyperphosphoryliert vorliegt, führte zu der Vermutung, dass es sich hierbei um einen Artefakt wie Autophosphorylierung der Kinase handeln könnte. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde ein Stamm hergestellt, der *mak-2-gfp-caax* im Deletionshintergrund des für die MAPKK kodierenden Gens *mek-2* exprimiert. Hierzu wurde das Plasmid p25(*ptef-1-mak-2-gfp-caax*) hergestellt und in den Stamm N2-41 ($\Delta mek-2$) transformiert. Sporen von 10 erhaltenen Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und der Stamm MT-41-275 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$), der das intensivste Fluoreszenzsignal aufwies, behalten. Da die Sporen eine ungleichmäßige Fluoreszenz aufwiesen, wurde der Stamm über eine Einzelsporisolierung

3. Ergebnisse

aufgereinigt und Sporen von 5 Einzelsporisolaten auf ihre Fluoreszenz überprüft. Der Stamm MT-41-384 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) mit der besten Fluoreszenz wurde für weitere Analysen behalten.

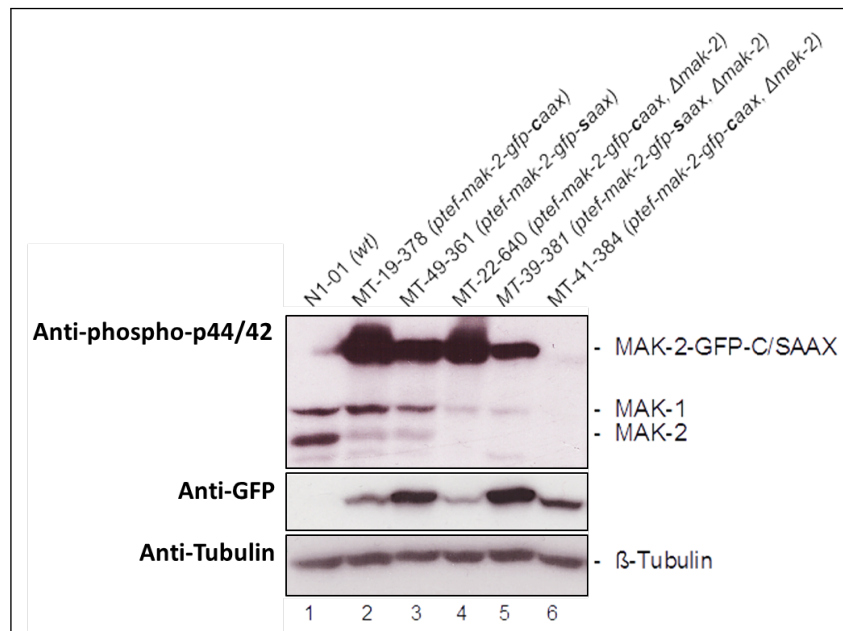


Abbildung 3.26.: Membranrekrutierung von MAK-2 führt zur Hyperphosphorylierung der Kinase
Exemplarisches Bild einer Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten der Stämme N1-01 (Wildtyp), MT-19-378 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*), MT-49-361 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*), MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$), MT-39-381 (*ptef-1-mak-2-gfp-saax*, $\Delta mak-2$) und MT-41-384 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) aus Schüttelkulturen nach 20 Stunden Inkubationszeit bei 30°C. Der Antikörper Anti-phospho-p44/42 weist spezifisch die phosphorylierte Form von MAK-2(-GFP-C/SAAX) nach, während der Antikörper Anti-GFP alle GFP-Fusionskonstrukte nachweist. Der Anti-Tubulin-Antikörper erkennt das Haushaltsprotein β -Tubulin.

Um zu zeigen, dass die Hyperphosphorylierung von MAK-2-GFP-CAAX tatsächlich durch die MAPKK MEK-2 vermittelt wird, wurde der Phosphorylierungsstatus von MAK-2-GFP-CAAX in dem Stamm MT-41-384 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) überprüft. Dieser Stamm enthält das *mak-2-gfp-caax*-Konstrukt im $\Delta mek-2$ -Hintergrund. Die Reaktion mit dem anti-GFP-Antikörper zeigte, dass MAK-2-GFP-CAAX vorhanden ist (Spur 6). Die fehlende MAK-2-GFP-CAAX-Bande in der anti-Phospho-Antikörperreaktion (Spur 6) zeigt daher zuverlässig, dass MEK-2 notwendig für die Hyperphosphorylierung von MAK-2-GFP-CAAX ist. Daraus lässt sich folgern, dass die Hyperphosphorylierung von MAK-2-GFP-CAAX wie für andere MAP-Kinasen beschrieben durch die MAP-Kinasen-Kaskade-Komponenten MEK-2 und NRC-1 durchgeführt wird. Die Antikörperreaktion mit dem anti-Tubulin Antikörper weist in al-

len Stämmen gleichmäßig intensive Banden auf und zeigt, dass in allen Proben vergleichbare Mengen Gesamtprotein eingesetzt wurden.

Zusammengefasst zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass die permanent membrangebundene Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX nicht funktional ist und bei Überexpression im Wildtyp-Hintergrund einen negativen Einfluss auf die Kommunikation zwischen interagierenden Keimlingen ausübt. Diese Ergebnisse bestätigen den erwarteten engen Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Funktion der Kinase. Entgegen unseren Erwartungen liegt das nicht-funktionale MAK-2-GFP-CAAX an der Plasmamembran hyperphosphoryliert vor. Hieraus wird auch ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Aktivität der Kinase ersichtlich. Obwohl MAK-2-GFP-CAAX an der Membran aktiviert vorliegt, kann die Kinase aufgrund räumlicher Restriktionen die Funktion nicht erfüllen und übt im Wildtyp-Hintergrund darüber hinaus einen negativen Effekt auf den Gesamtprozess der Zellkommunikation aus. Der bereits zuvor beobachtete schnelle Abbau der membrangebundenen Kinase wurde in diesen Experimenten bestätigt, und es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von MAK-2 abhängig von der MAPKK MEK-2 ist.

3.3.6. Membrangebundenes MEK-2-GFP-CAAX komplementiert den Deletionsphänotyp der $\Delta mek-2$ -Mutante partiell

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine permanente Missrekrutierung von MAK-2-GFP-CAAX an die Plasmamembran zu einer Hyperphosphorylierung der Kinase führt (Abschnitt 3.3.5). Obwohl eine Aktivierung von MAK-2 durch Phosphorylierung notwendig für die Funktion der Kinase ist, ist dies alleine nicht ausreichend zur Ausübung ihrer Funktion. Die hyperphosphorylierte Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX übernimmt die Funktion der nativen Kinase nicht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die subzelluläre Dynamik von MAK-2 ebenfalls eine essentielle Rolle für die Funktion der Kinase spielt.

Untersuchungen in der Hefe *S. cerevisiae* haben zuvor gezeigt, dass eine zu MAK-2 homologe Kinase Fus3 nach ihrer Aktivierung verstärkt im Zellkern lokalisiert. Dort reguliert sie den Transkriptionsfaktor Ste12 und phosphoryliert weitere Zielproteine [Blackwell et al., 2007], was zur Änderung der Expression von über 200 *Mating* spezifischen Genen führt [Roberts et al., 2000]. In *N. crassa* lokalisiert MAK-2 ebenfalls im Nukleus (Abschnitt 3.2.1), wobei eine Änderung in der Lokalisation während der Keimlingsinteraktionen nicht genauer untersucht wurde. Dennoch deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Membranrestriktion von MAK-2-GFP-CAAX die Translokation der Kinase in den Zellkern und somit die Anpassung der Genexpression verhindert, die für die Zell-Zell-Kommunikation essentiell ist.

Die MAK-2 vorangestellte MAPKK MEK-2 aus *N. crassa*, die während der Signalweiterleitung vermutlich MAK-2 phosphoryliert und somit aktiviert (Abschnitt 3.3.5, Maerz et al. [2008]), zeigt während der Keimlingsinteraktion eine ähnliche subzelluläre Dynamik wie MAK-2, bleibt im Gegensatz zu dieser aber in Keimlingen und reifen Hyphen aus den Zellkernen ausgeschlossen. Eine regulatorische Funktion im Zellkern wird daher für MEK-2 nicht erwartet. Um die Rolle der subzellulären Dynamik des MAP-Kinasen-Moduls genauer zu entschlüsseln, wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit die MAPKK MEK-2 über einen CAAX-Anker permanent an die Plasmamembran gebunden. Diese künstlich misslokalisierte Kinasevariante MEK-2-GFP-CAAX wurde im Wildtyp- und im *mek-2*-Deletionshintergrund exprimiert und der Einfluss auf die allgemeine Entwicklung und die Keimlingsinteraktionen im Speziellen untersucht.

Um *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des nativen Promotors in der Δ *mek-2* Mutante zu exprimieren, wurde das Plasmid p45 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*) hergestellt und in den Stamm N2-41 (Δ *mek-2*, *his-3*⁻) transformiert. Sporen von 11 Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und der Stamm MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) mit einem schwachen aber sichtbaren Fluoreszenzsignal für weitere Analysen verwendet. Da Lokalisationsstudien von MEK-2-GFP-Fusionsproteinen mit dem nativen *mek-2*-Promotor in Keimlingen bisher nicht erfolgreich waren (Abschnitt 3.1.2), wurden alle hier erstellten *mek-2-gfp(-caax)*-Konstrukte zusätzlich mit Hilfe des starken *tef-1*-Promotors exprimiert. Hierzu wurden die Plasmide p48 und p49 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) hergestellt und in den Stamm N2-41 (Δ *mek-2*, *his-3*⁻) transformiert. Es wurden Sporen von 15 bzw. 5 erhaltenen Transformanten auf ihre Fluoreszenz überprüft, und die Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) mit dem jeweils stärksten Fluoreszenzsignal für weitere Untersuchungen behalten. Zur Kontrolle wurden Stämme hergestellt, die *mek-2-gfp* mit Hilfe des nativen bzw. des starken *tef-1*-Promotors im Δ *mek-2*-Hintergrund exprimieren. Hierzu wurden die Plasmide p39 (*pmek-2-mek-2-gfp*) und p54 (*ptef-1-mek-2-gfp*) hergestellt und in den Stamm N2-41 (Δ *mek-2*, *his-3*⁻) transformiert. Sporen von 10 bzw. 3 Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und die Stämme MT-44-420 (*pmek-2-mek-2-gfp*, Δ *mek-2*) bzw. MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, Δ *mek-2*) für weitere Analysen verwendet.

Die Lokalisation von MEK-2-GFP-CAAX wurde in Keimlingen und reifen Hyphen der Stämme MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) bzw. MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) untersucht und mit der Lokalisation von MEK-2-GFP in den Kontrollstämmen MT-44-420 (*pmek-2-mek-2-gfp*, Δ *mek-2*) bzw. MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, Δ *mek-2*) verglichen. In Keimlingen der Stämme MT-44-420 und MT-42-279, die *mek-2-gfp(-caax)* mit Hilfe des nativen Promotors exprimieren, war das Fluoreszenzsignal zu schwach für eine Lokalisierung der Fusionsproteine. In diesen beiden Stämmen wurde die Lokalisierung von MEK-2-GFP(-CAAX) daher in reifen Hyphen durchgeführt. Wie erwartet lokalisiert MEK-2-GFP-CAAX überall an der Plasmamembran (Abbildung 3.27B), während MEK-2-GFP schwach cytoplasmatisch zu sehen ist und stark um die Septenpore herum akkumuliert (Abbildung 3.27A). Die Expression von *mek-2-gfp(-caax)* mit Hilfe des *tef-1*-Promotors führte sowohl in Keimlingen als auch in Hyphen zu einem starken Fluoreszenzsignal. Während MEK-2-

3. Ergebnisse

GFP-CAAX in Hyphen und in nicht-interagierenden Keimlingen des Stammes MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) deutlich an der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 3.27D und F), liegt MEK-2-GFP in dem Stamm MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) cytoplasmatisch vor und akkumuliert um die Septenpore (Abbildung 3.27C und E). Dabei ist MEK-2-GFP wie zuvor beschrieben aus dem Zellkern ausgeschlossen, wie an den schwarzen Aussparungen zu erkennen ist (Abschnitt 3.2.2 und Abbildung 3.27C und E). In interagierenden Keimlingen des Stammes MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) wird MEK-2-GFP oszillierend an die Spitzen der Keimlinge rekrutiert und akkumuliert nach Herstellung des Zell-Zell-Kontakts am Berührungspunkt (Abbildung 3.28).

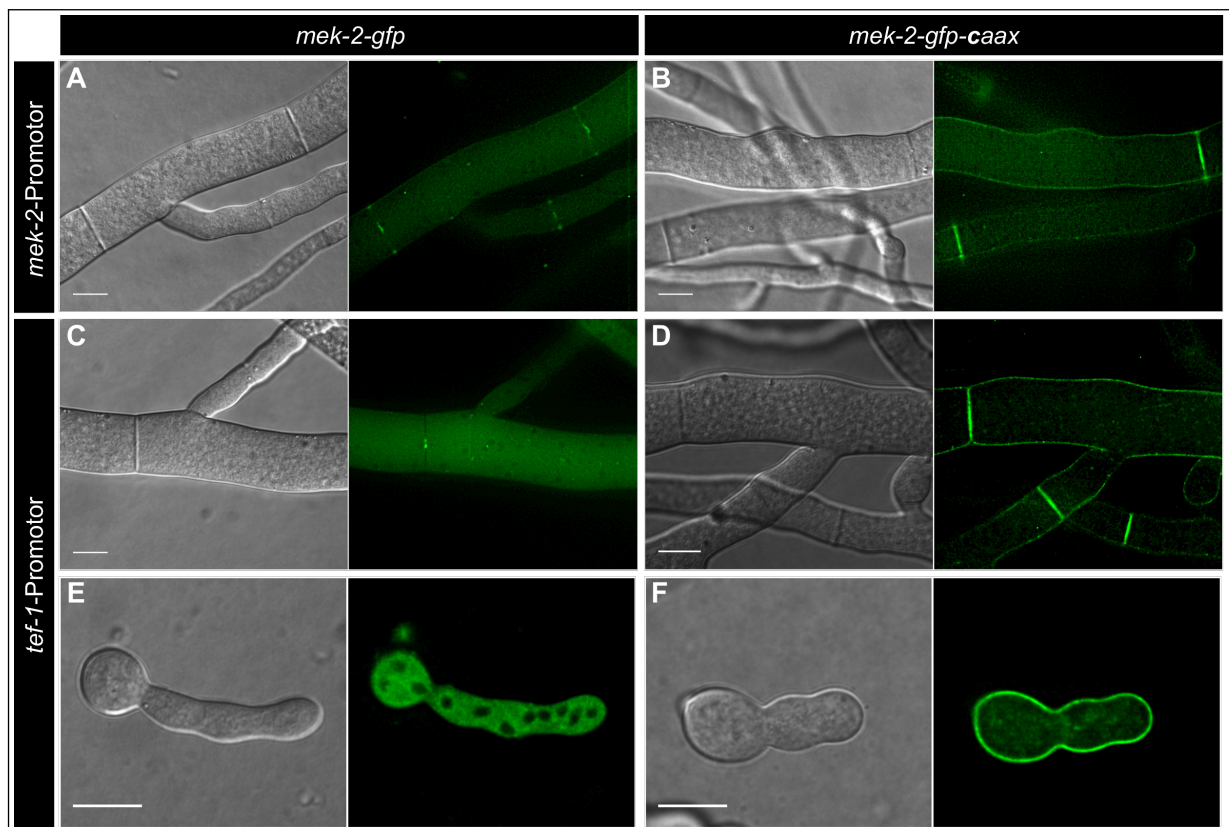


Abbildung 3.27.: Promotorabhängige Lokalisation von MEK-2-GFP und MEK-2-GFP-CAAX in Hyphen und nicht-interagierenden Keimlingen

A) MEK-2-GFP lokalisiert in reifen Hyphen des Stammes MT-44-420 (*pmek-2-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) leicht cytoplasmatisch und akkumuliert an den Septen. B) In dem Stamm MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) lokalisiert MEK-2-GFP-CAAX an der Plasmamembran untersuchter Hyphen. C und E) In dem Stamm MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) lokalisiert MEK-2-GFP cytoplasmatisch und ist aus den Zellkernen ausgeschlossen. In reifen Hyphen akkumuliert MEK-2-GFP um die Septenpore. D und F) In reifen Hyphen und Keimlingen des Stammes MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) lokalisiert MEK-2-GFP-CAAX deutlich an der gesamten Plasmamembran. Maßstab: 10µm.

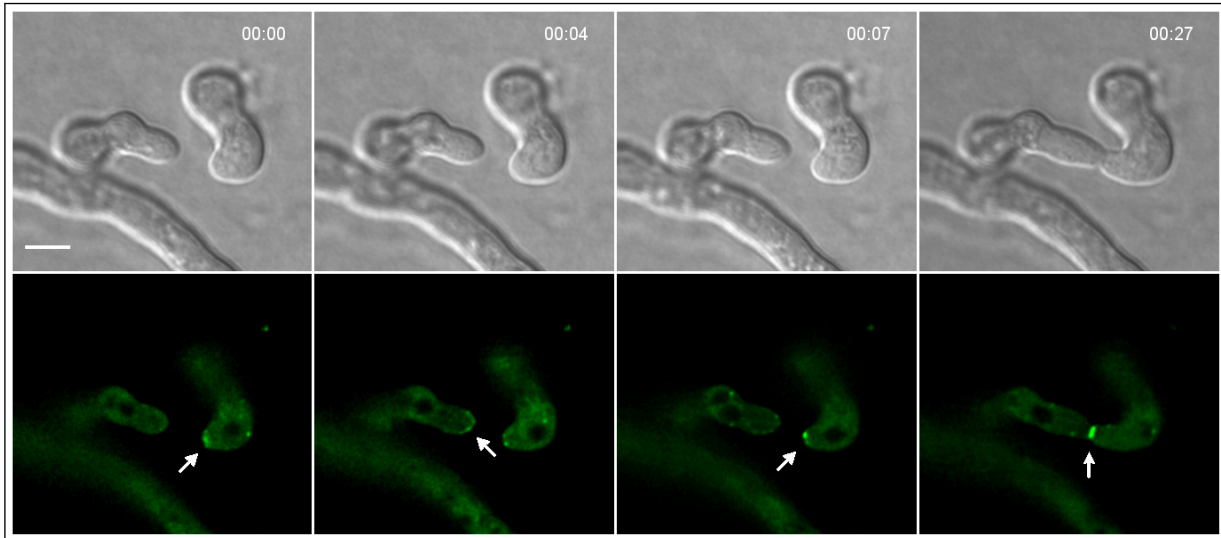


Abbildung 3.28.: MEK-2-GFP oszilliert im $\Delta mek-2$ -Hintergrunde an den Spitzen interagierender Keimlinge

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des Stammes MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) zeigen, dass MEK-2-GFP oszillierend an den Spitzen interagierender Keimlinge lokalisiert. Während MEK-2-GFP zu Beginn der Zeitreihe an der Spitze des rechten Keimlings akkumuliert, ist nach 4 Minuten ein starkes Fluoreszenzsignal an der Spitze des linken Keimlings zu sehen. Nach weiteren drei Minuten ist MEK-2-GFP wieder an der Spitze des rechten Keimlings zu sehen. Nachdem die Keimlinge sich berühren akkumuliert MEK-2-GFP an der Kontaktstelle (weiße Pfeile). Maßstab: 5 µm.

Nachdem die erwartete Membranlokalisation von MEK-2-GFP-CAAX in den Stämmen MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) und MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) fluoreszenzmikroskopisch bestätigt wurde, sollte untersucht werden, ob die künstlich membrangebundene Kinasevariante die Funktion der nativen MAPKK MEK-2 ersetzen kann. Hierzu wurden charakteristische Merkmale der $\Delta mek-2$ -Mutante in den *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen untersucht und mit den Kontrollstämmen verglichen. Es wurde erwartet, dass die untersuchten Merkmale in den *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen ganz oder partiell komplementiert werden, wenn die membrangebundene Kinase die Funktion der nativen Kinase ganz oder partiell übernehmen kann. Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Komplementation der Defekte der $\Delta mek-2$ -Mutante kann dabei bereits der makroskopische Phänotyp geben. Während die $\Delta mek-2$ -Mutante flach auf dem Agar wächst, bilden der Wildtyp und die *mek-2-gfp*-Kontrollstämmen ein typisches Luftmyzel aus (Abbildung 3.29A). Der makroskopische Phänotyp der *mek-2-gfp-caax*-Stämme befindet sich dazwischen: besonders die Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$), zwei Transformanten mit identischem Genotyp, bilden im Gegensatz zum Wildtyp reduzierte Lufthyphen aus und weisen ein verändertes Sporulationsmuster auf (Abbildung 3.29A). Um diese partielle Komple-

3. Ergebnisse

mentation der *mek-2*-Defekte genauer zu beschreiben, wurden die makroskopischen Merkmale Längenwachstum, sowie die Bildung von Lufthyphen und Sporen quantifiziert.

Eine genaue Untersuchung des Längenwachstums zeigte, dass der Wildtyp mit durchschnittlich $9,7 \pm 0,3$ cm am Tag das schnellste Wachstum aufweist, während der Δ *mek-2*-Stamm mit etwa $3,1 \pm 0,3$ cm/Tag am langsamsten wächst. Interessanterweise wachsen die *mek-2-gfp*-exprimierenden Kontrollstämme MT-44-420 (*pmek-2-mek-2-gfp*, Δ *mek-2*) und MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, Δ *mek-2*) statistisch gesehen signifikant langsamer als der Wildtyp ($p \leq 0,01$) und vergleichbar schnell wie der Stamm MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*), der mit etwa $8,9 \pm 0,2$ cm/Tag ein fast dreimal so schnelles Wachstum wie die *mek-2*-Deletionsmutante aufweist ($p \leq 0,001$). Die Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) wachsen mit etwa $7,4 \pm 0,3$ cm/Tag signifikant langsamer als der Stamm MT-42-279, der *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des nativen Promotors exprimiert ($p \leq 0,001$), aber mehr als doppelt so schnell wie der Δ *mek-2*-Stamm N3-15 ($p \leq 0,001$) (Abbildung 3.29B).

Eine Quantifizierung des Lufthyphenwachstums zeigte, dass die Lufthyphen des Wildtyps mit durchschnittlich $13,8 \pm 1,8$ mm/Tag etwa 5 mal so lang wachsen wie die Lufthyphen des *mek-2*-Deletionsstamms mit einem durchschnittlichen Wachstum von $2,7 \pm 0,4$ mm/Tag. Der Stamm MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) weist ebenso wie die Kontrollstämme MT-44-420 (*pmek-2-mek-2-gfp*, Δ *mek-2*) und MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, Δ *mek-2*) keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf. Das Lufthyphenwachstum der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) ist mit einem durchschnittlichen Längenwachstum von etwa $9,1 \pm 0,6$ bzw. $10,1 \pm 0,9$ mm/Tag im Vergleich zum Wildtyp um etwa 30 % reduziert ($p \leq 0,01$) und im Vergleich zu der Δ *mek-2*-Mutante etwa 3 mal so lang ($p \leq 0,001$) (Abbildung 3.29C). Es sollte aber beachtet werden, dass diese Messungen rein qualitativ die Länge der Lufthyphen widerspiegelt, aber nichts über die Quantität der Lufthyphen aussagt. Während der Stamm MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) nach 7 Tagen Wachstum ein dichtes Luftmyzel bildet, das vom Wildtyp nicht unterschieden werden kann, bilden die Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) vergleichsweise wenig Lufthyphen (Abbildung 3.29A).

Die Quantifizierung der Sporenproduktion zeigte, dass der Wildtyp unter den gewählten Inkubationsbedingungen im Durchschnitt etwa $25,1 \pm 9,1 \cdot 10^7$ Konidien pro Röhrchen bildet, wobei eine hohe Variabilität in der Sporenproduktion beobachtet wurde. Der Teststamm MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) bildet durchschnittlich etwa $12,6 \pm 3,5 \cdot 10^7$ Konidien pro Kulturröhrchen und unterscheidet sich damit aus statistischer Sicht nicht signifikant von dem Wildtypstamm N1-01. Auch die Kontrollstämme MT-44-420 (*pmek-2-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) und MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) unterscheiden sich hinsichtlich der Menge gebildeter Konidien nicht signifikant vom Wildtyp. Im Gegensatz hierzu ist die Sporenproduktion in dem *mek-2*-Deletionsstamm mit etwa $1,1 \pm 3,5 \cdot 10^7$ Sporen pro Kulturröhrchen im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert ($p \leq 0,01$). Die Menge der gebildeten Konidien in dem Stamm MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) liegt bei durchschnittlich $5,3 \pm 0,8 \cdot 10^7$ und $7,1 \pm 2,2 \cdot 10^7$ Sporen pro Kulturröhrchen und unterscheidet sich damit signifikant von der Menge gebildeter Sporen im Wildtyp ($p \leq 0,05$) und in dem $\Delta mek-2$ -Stamm N3-15 ($p \leq 0,01$) (Abbildung 3.29D).

Die Quantifizierung charakteristischer Merkmale der *mek-2*-Deletionsmutante in den Teststämmen MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$), sowie MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) zeigte eine vollständige oder partielle Komplementation der Defekte der $\Delta mek-2$ -Mutante. Dabei wurde beobachtet, dass der Stamm MT-42-279, in dem *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des nativen Promotors exprimiert wird, die Defekte des $\Delta mek-2$ -Stammes fast vollständig komplementiert und sich ebenso wie die Kontrollstämme MT-44-420 (*pmek-2-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) bzw. MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) verhält. Im Vergleich hierzu komplementieren die Stämme MT-43-286 und MT-43-287, die *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des *tef-1*-Promotors überexprimieren, die Defekte der *mek-2*-Deletionsmutante nur teilweise. Die Ausprägung der untersuchten Merkmale unterscheidet sich in diesen Stämmen sowohl signifikant vom Wildtyp als auch von der Deletionsmutante und befindet sich zwischen den Merkmalsausprägungen dieser beiden Kontrollstämme. Die Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) verhalten sich untereinander ähnlich und zeigen keine signifikanten Abweichungen voneinander in der Ausprägung der untersuchten Merkmale.

3. Ergebnisse

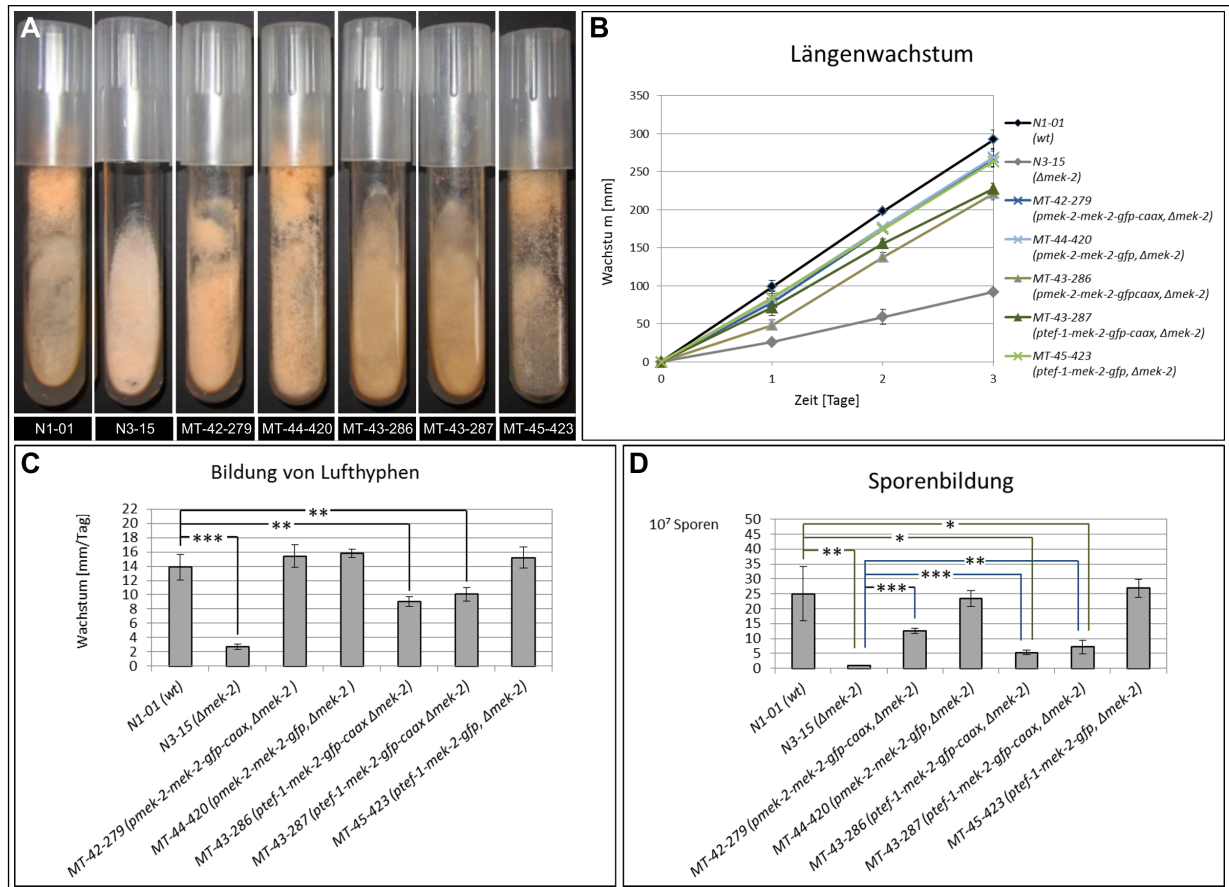


Abbildung 3.29.: Quantifizierung makroskopischer Merkmale der Stämme MT-42-279, MT-43-286 und MT-43-287

A) Vergleich der makroskopischen Phänotypen der untersuchten Stämme auf Röhren mit Minimalmedium nach 7 Tagen Wachstum. B) Quantifizierung des Längenwachstums, C) des Lufthyphenwachstums und D) der Menge gebildeter Konidien pro Kulturröhrchen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen aus je 5 unabhängig voneinander wiederholten Experimenten.

Die partielle Komplementation der untersuchten phänotypischen Merkmale deuten darauf hin, dass die Expression von *mek-2-gfp-caax* möglicherweise auch zu einer Komplementation des Fusionsphänotyps der $\Delta mek-2$ -Mutante führen könnte. Um diese Frage zu beantworten, wurden Keimlinge der zu untersuchenden Stämme mikroskopisch untersucht und die Rate interagierender Keimlinge quantifiziert. Dabei offenbarten die mikroskopischen Untersuchungen Unterschiede bei den Keimlingsinteraktion, aber auch in dem generellen Wachstumsverhalten von Keimlingen der untersuchten Stämme.

Wie erwartet zeigen Keimlinge des Wildtyps nach 6 Stunden Inkubationszeit gesundes Wachstum und eine Interaktionsrate von durchschnittlich $97,9 \pm 1,9$ % (Abbildung 3.30A und B), während Keimlinge des $\Delta mek-2$ -Stamms N3-15 gerade aneinander vorbei wachsen und auch nach einer zufälligen Berührung nicht miteinander fusionieren (Abbildung 3.30A und C). In dem Kontrollstamm MT-44-420 (*pmek-2-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) interagieren durchschnittlich $76,8 \pm 9,3$ % der Keimlinge miteinander, wobei aus statistischer Sicht kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp besteht (Abbildung 3.30A und E). Die mikroskopischen Analysen von Keimlingen des Stammes MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) zeigen dagegen eine signifikante Reduktion der Keimlingsinteraktionsrate um etwa 60 % im Vergleich zum Wildtyp ($p \leq 0,01$) (Abbildung 3.30A). Darüber hinaus weisen die Keimlinge eine im Vergleich zum Wildtyp leicht veränderte Morphologie mit dickeren Keimschläuchen auf (Abbildung 3.30G). Der *mek-2-gfp-caax*-exprimierende Stamm MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) zeigt mit durchschnittlich $8 \pm 0,5$ % interagierenden Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion der Interaktionsrate um etwa 92 % ($p \leq 0,001$). Damit liegt die Interaktionsrate des Stammes MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) zwischen denen des Kontrollstamms MT-44-420 (*pmek-2-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) und der *mek-2*-Deletionsmutante N3-15, und weicht statistisch gesehen von beiden signifikant ab ($p \leq 0,01$) (Abbildung 3.30A). Während des Wachstums weisen die Keimlinge weitestgehend eine ähnliche Morphologie wie die Keimlinge des Wildtyps auf (Abbildung 3.30D). Keimlinge der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) weisen dagegen eine auffällige Morphologie auf, die auf einen Polaritätsdefekt schließen lässt. Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurden perlenkettenartige und häufig verzweigte Strukturen beobachtet, aus denen keine typische Keimlingsform ersichtlich wird (Abbildung 3.30F). Anhand dieser untypischen Morphologie ist es nicht möglich Keimlings-

interaktionen zuverlässig zu identifizieren, sodass in diesen Stämmen keine Quantifizierung der Interaktionsrate erfolgte.

Die ungewöhnlichen Strukturen, die nach 6 Stunden Inkubationszeit in den Stämmen MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) beobachtet wurden, ließen zunächst keine zuverlässigen Rückschlüsse über ihre Entstehung zu. Auf Grund ihrer stark veränderten Morphologie war es zunächst unklar, ob es sich bei den vorhandenen Strukturen wirklich um Keimlinge handelte oder um unvollständig voneinander getrennte Sporen, die ein stark vermindertes Wachstum aufwiesen. Um diese Frage genauer zu untersuchen, wurden die nach 6 Stunden Inkubationszeit entstandenen Strukturen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Während ihrer Entstehung am Konidiophor werden Sporen durch eine Zellwand getrennt, bevor sie sich von dem reifen Konidiophor lösen ([Springer and Yanofsky, 1989]). Es wurde daher erwartet, dass die einzelnen runden Strukturen der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) vollständig von einer Plasmamembran umgeben sind, falls es sich um nicht vollständig getrennte Sporen handelt. Sollten die ungewöhnlichen Strukturen durch Wachstum und/oder Fusionsereignisse entstanden sein, wurde dagegen erwartet, dass die runden Formen in einem cytoplasmatischen Kontinuum miteinander verbunden sind. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen zeigten deutlich, dass die runden Strukturen miteinander verbunden sind (Abbildung 3.30H). In fluoreszenzmikroskopischen Schichtaufnahmen der untersuchten Strukturen ist gut zu erkennen, dass die einzelnen runden Strukturen nicht vollständig von einer Membran umgeben sind, sondern sich ein gemeinsames Cytoplasma teilen, was an den schwarzen Aussparungen des Fluoreszenzsignals an den Kontaktstellen ersichtlich wird (Abbildung 3.30I, weiße Pfeile).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei den Strukturen nicht um unvollständig getrennte Konidien handelt, sondern um Strukturen die sich während der sechsstündigen Inkubationszeit gebildet haben. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob diese Strukturen tatsächlich durch Wachstum entstanden sind, oder ob benachbarte Konidien dieser Stämme ohne die Ausbildung typischer Keimschläuche miteinander fusionieren wenn sie sehr dicht beieinander liegen. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Entwicklung von Sporen des Stammes MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) über einen Zeitraum von 9

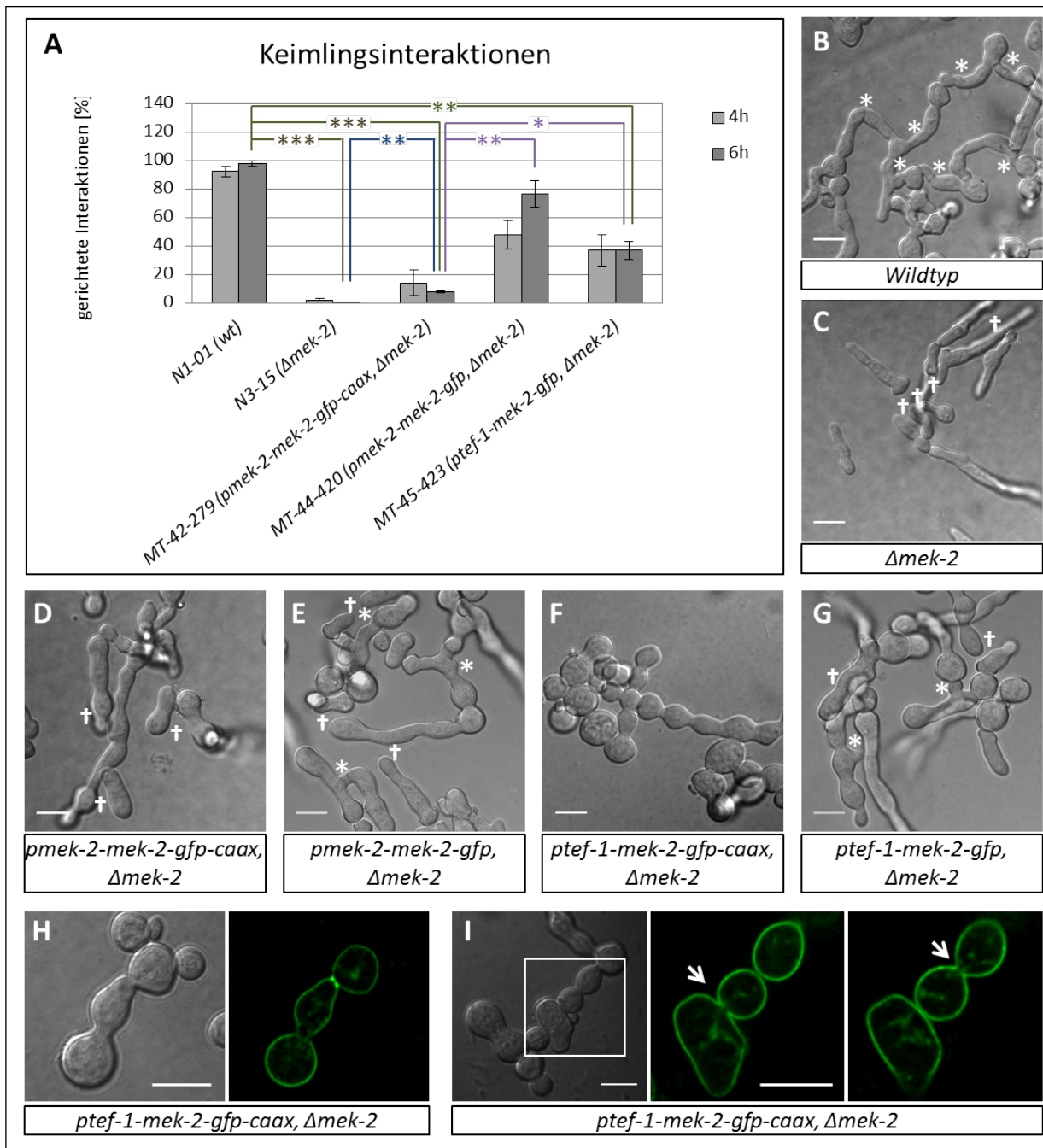


Abbildung 3.30.: Mikroskopische Untersuchungen von Keimlingen, die *mek-2-gfp-caax* im $\Delta mek-2$ -Hintergrund exprimieren

A) Quantifizierung der Keimlingsinteraktionen in den Stämmen N1-01 (wt), N3-15 ($\Delta mek-2$), MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$), MT-44-420 (*pmek-2-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$) und MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen aus 3 unabhängig voneinander wiederholten Experimenten an, in denen jeweils zwischen 100 und 211 Keimlinge gezählt wurden. B) Exemplarische Ausschnitte von Keimlingen der Stämme N1-01, C) N3-15, D) MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$), E) MT-44-420 (*pmek-2-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$), F) MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) und G) MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, $\Delta mek-2$). H) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Keimlingen der Stämme MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) und I) MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$). Maßstab: 10 μm .

3. Ergebnisse

Stunden unter dem Mikroskop beobachtet und mit der Entwicklung von Sporen des Wildtyps verglichen.

Die mikroskopischen Untersuchungen von Keimlingen zeigten starke Unterschiede in der frühen Entwicklungsphase zwischen dem Wildtyp und dem Stamm MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*). Wenn Sporen des Wildtyps keimen, bilden sie polar wachsende Keimschläuche. Diese verlängern sich im Laufe der Zeit durch polares Wachstum an der Spitze. Wenn ein oder mehrere Keimlinge in räumliche Nähe zueinander gelangen, verändern die Keimschläuche ihre Wachstumsrichtung und wachsen gezielt auf den Interaktionspartner zu. Nachdem die Keimlinge sich berühren, fusionieren sie und bilden so ein verzweigtes Netzwerk. Die ersten Keimlingsinteraktionen finden dabei nach ein bis zwei Stunden statt. Nach zwei bis drei Stunden fusionieren viele Keimlinge bis diese Entwicklung nach etwa 4 Stunden zu einem großen Teil abgeschlossen ist (Abbildung 3.31A, statistische Analysen der Keimlingsinteraktionen in Abschnitt 3.3.3).

Im Gegensatz zum Wildtyp findet die frühe Entwicklung des Stammes MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) über einen längeren Zeitraum statt und weist deutliche Morphologische Unterschiede auf. Die Sporen des Stammes MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) keimen wie die Sporen des Wildtyps nach ein bis zwei Stunden aus und bilden kurze Keimschläuche. Die Keimschläuche wachsen zunächst allerdings nicht polar an der Spitze, sondern schwellen zu runden Strukturen an, die die Spore an Größe übertreffen kann. Nach dieser ersten Phase isotropen Wachstums etablieren die Keimschläuche kurzfristig eine neue Polaritätsachse, aus der ein neuer Keimschlauch entsteht. Dieser verliert sein polares Wachstum und schwillt an, sodass eine Furche zwischen den angeschwollenen Keimschläuchen entsteht. Dieser Zyklus kann sich mehrmals wiederholen, bis die Keimschläuche nach etwa 8 Stunden ihre polares Wachstum stabilisieren und lange Keimschläuche bilden (Abbildung 3.31B linke Spalte). Diese Beobachtungen zeigen, dass die perlenkettenartigen Strukturen des Stammes MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) durch Wachstum entstehen. Die beobachteten Keimlinge zeigten dabei keine gerichteten Interaktionen mit anderen Keimlingen und fusionierten auch nach zufälligen Berührungen nicht. Fluoreszenzmikroskopische Schichtaufnahmen sich berührender Keimlinge des Stammes MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*), in denen die Plasmamembran mit Hilfe der membrangebundenen Kinasevariante MEK-2-

GFP-CAAX gut sichtbar ist, zeigen durchgängig intensive Fluoreszenzsignale zwischen den Keimlingen, was auf eine intakte Plasmamembran ohne Fusionspore schließen lässt (Abbildung 3.31B rechte Spalte). Es lässt sich mit diesem Experiment aber nicht komplett ausschließen, dass Keimlingsinteraktionen -und Fusionen in reduziertem Umfang stattfinden.

Auf Grund der stark veränderten Morphologie von Keimlingen des Stammes MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*), sind diese schwer zugänglich für die Untersuchung von Interaktions- und Fusionsereignissen. In reifen Myzelien von *N. crassa* finden im Inneren Teil der Kolonie ebenfalls Zellinteraktionen und -fusionen zwischen Hyphen statt, die möglicherweise auf ähnlichen molekularen Grundlagen wie die Keimlingsfusion beruhen [Read et al., 2010; Jonkers et al., 2014]. Um die Frage abschließend zu beantworten, ob prinzipiell vegetative Zellfusionen in dem Stamm MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) stattfinden, wurden in reifen Myzelien der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) nach Hyphenfusionen gesucht. Die reifen Hyphen dieser Stämme weisen im Gegensatz zu den Keimlingen keinen Polaritätsdefekt auf, sondern zeigen ein ähnliches Wachstum wie der Wildtyp, und sind daher experimentell einfacher zugänglich.

Die mikroskopischen Analysen von Hyphen wurden zunächst in dem Wildtyp-Stamm N1-01 durchgeführt, wo im Inneren der Kolonie Hyphenfusionen beobachtet wurden. Hierfür bilden sich an parallel zueinander verlaufenden Hyphen typischerweise kurze Fusionshyphen, die miteinander interagieren und fusionieren (Abbildung 3.32A, [Hickey et al., 2002]). Vergleichbare Fusionsereignisse wurden auch im Inneren von Kolonien der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) gefunden (Abbildung 3.32B und C). Um zu überprüfen, ob Hyphen dieser Stämme auch wirklich erfolgreich miteinander fusionieren, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Ein erfolgreiches Fusionsereignis zeichnet sich durch die Bildung einer Fusionspore aus, durch die unter anderem Cytoplasma und Organellen passieren können [Hickey et al., 2002]. Da die untersuchten Stämme die membrangebundene Kinasevariante MEK-2-GFP-CAAX exprimieren, kann die Plasmamembran in diesen Stämmen fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Die Untersuchungen des Stammes MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) bestätigten, dass Hyphen im Inneren der Kolonie erfolgreich miteinander fusionieren. Zwischen sich berührenden Hyphen im Inneren der Kolonie bilden sich erfolgreich Fusionsporen, die fluoreszenzmikroskopisch als

3. Ergebnisse

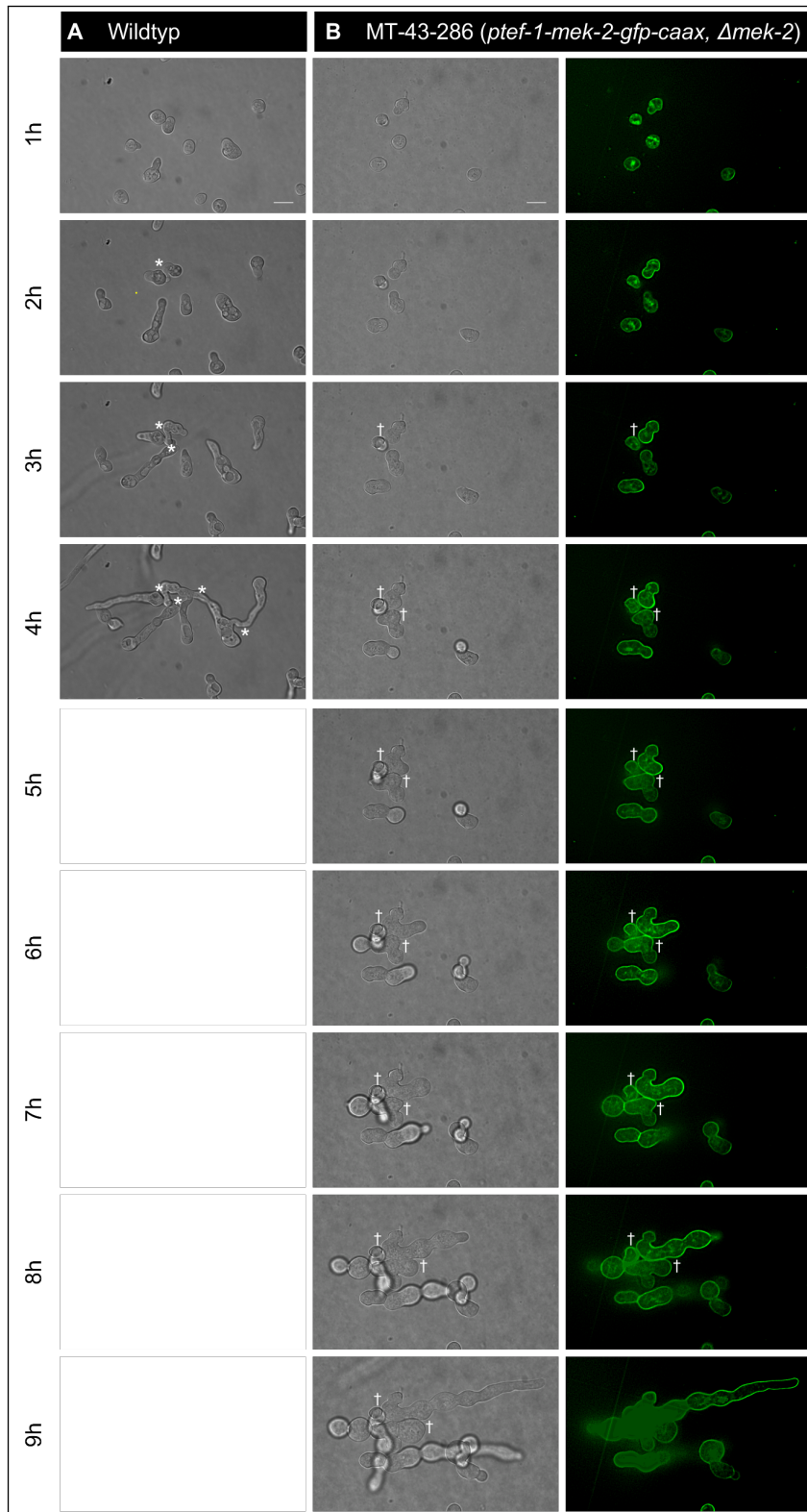


Abbildung 3.31.: Entwicklung von Sporen des Wildtyps und des Stammes MT-43-286

A) *Live Cell Imaging* von der Entwicklung von Sporen des Wildtyps und B) des Stammes MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*). Fusionsstellen sind mit einem Sternchen markiert und Berührungsstellen, die zu keinem Fusionsereignis führen mit einem Kreuz. Maßstab: 10 μ m.

schwarze Aussparung der Membranfluoreszenz sichtbar sind (3.32D, weißer Pfeil). Diese Ergebnisse zeigen, dass die subzelluläre Dynamik von MEK-2 (im Gegensatz zu der Dynamik der *Upstream*-Kinase MAK-2) nicht essentiell für vegetative Zellfusionen ist.

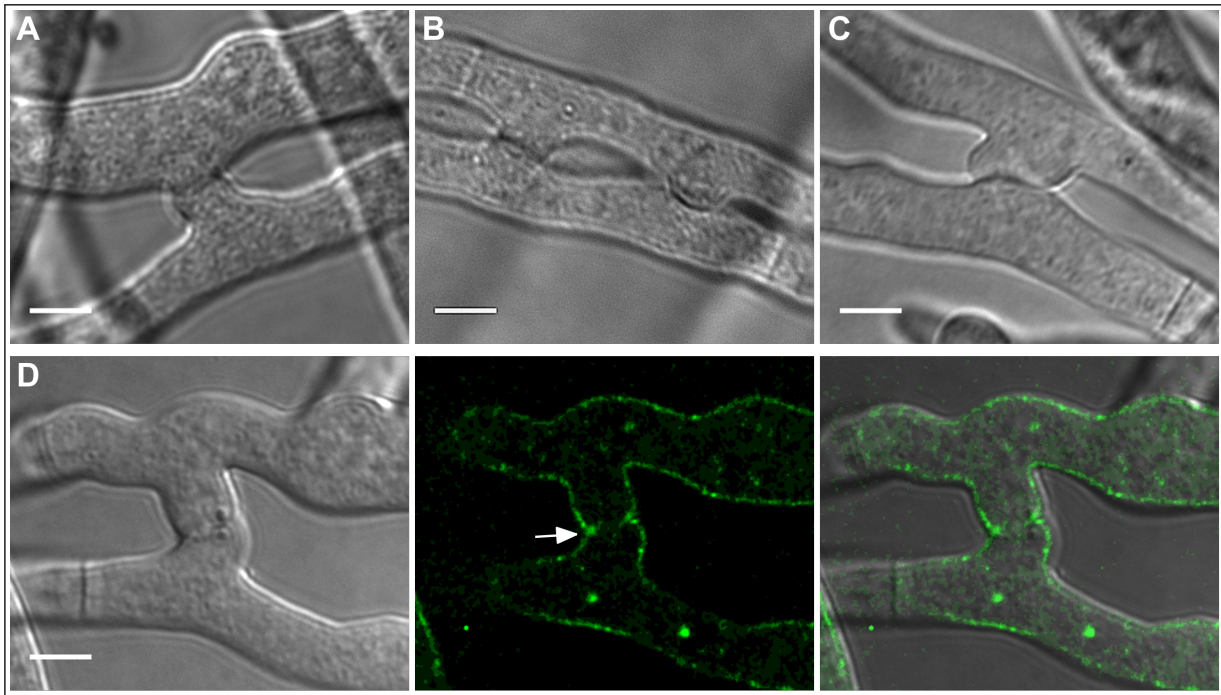


Abbildung 3.32.: Hyphenfusionen des Wildtyps und der Stämme MT-43-286 und MT-43-287

Mikroskopische Untersuchungen von fusionierenden Hyphen im Inneren von Kolonien A) des Wildtyps und B) der Stämme MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) und C) MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*). D) Ein erfolgreiches Fusionsereignis zwischen Hyphen des Stammes MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) in Durchlicht- (linke Spalte) und Fluoreszenzmikroskopie (mittlere Spalte), sowie einer Überlagerung beider Bilder (rechte Spalte). Die geöffnerte Fusionspore ist an der schwarzen Fluoreszenzaussparung zwischen den beiden Hyphen (weißer Pfeil, mittlere Spalte) gut zu erkennen. Maßstab: 5µm.

3.3.7. Überexpression von membrangebundenem MEK-2 wirkt sich negativ auf Keimlingsinteraktionen aus

Die Expression von *mek-2-gfp-caax*, das für die membrangebundenen Kinasevariante MEK-2-GFP-CAAX codiert, komplementiert im Δ *mek-2*-Hintergrund die Defekte der *mek-2*-Deletionsmutante partiell. Gleichzeitig trat in Keimlingen, die *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des *tef-1*-Promotors überexprimieren ein starker Polaritätsdefekt auf. Nach etwa 8 Stunden Wachstum erholten sich die Keimlinge weitestgehend von dem Polaritätsdefekt, sodass eine Entwicklung

zu unauffälligen, polar wachsenden Hyphen erfolgte (Abschnitt 3.3.6). Um die Effekte genauer zu untersuchen, die die membrangebundene Kinasevariante MEK-2-GFP-CAAX auf Wachstum und Entwicklung von *N. crassa* hat, wurde *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des nativen und des starken *tef-1*-Promotors im Wildtyp-Hintergrund exprimiert. Die Lokalisation von MEK-2-GFP-CAAX wurde in Keimlingen und reifen Hyphen bestimmt und charakteristische Merkmale der erhaltenen Stämme untersucht.

Um *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des nativen Promotors im Wildtyp-Hintergrund zu exprimieren, wurde das Plasmid p47 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*) hergestellt und in den Wildtyp-Stamm N1-03 (*his-3*) transformiert. Sporen von 13 erhaltenen Transformanten wurden auf ihre Fluoreszenz untersucht und der Stamm MT-29-249 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*) mit dem deutlichsten Fluoreszenzsignal für weitere Analysen verwendet. Als Kontrolle dienten die Stämme MT-68-553 und MT-36-300, die *mek-2-gfp-saax* bzw. *mek-2-gfp* unter der Kontrolle des nativen *mek-2*-Promotors im Wildtyp-Hintergrund exprimieren (Herstellung in [Letz, 2014] bzw. in Abschnitt 3.2.2). Um *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des starken *tef-1*-Promotors zu exprimieren, wurde das Plasmid p49 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) in den Wildtypstamm N1-03 (*his-3*) transformiert und Sporen von 15 Transformanten auf ihre Fluoreszenz untersucht. Der Stamm MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) wies das intensivste Fluoreszenzsignal auf und wurde für weitere Untersuchungen verwendet. Als Kontrolle dienten die Stämme MT-67-552 und MT-37-408, die *mek-2-gfp-saax* bzw. *mek-2-gfp* unter der Kontrolle des starken *tef-1*-Promotors im Wildtyp-Hintergrund exprimieren (Herstellung in [Letz, 2014] bzw. in Abschnitt 3.1.2).

Zunächst wurde die erwartete subzelluläre Lokalisation der verschiedenen MEK-2-GFP-(C/SAAX)-Kinasevarianten fluoreszenzmikroskopisch bestätigt. Aus den vorausgegangenen Lokalisationsstudien (Abschnitt 3.2.2) war bereits bekannt, dass MEK-2-GFP in den Kontrollstämmen MT-36-300 (*pmek-2-mek-2-gfp*) und MT-37-408 (*ptef-1-mek-2-gfp*) in reifen Hyphen um die Septenpore herum akkumuliert (Abbildung 3.10 in Abschnitt 3.2.2). In Keimlingen des Stammes MT-36-300, in dem *mek-2-gfp* mit Hilfe des nativen Promotors exprimiert wird, war das Fluoreszenzsignal zu gering für eine Lokalisation der Kinase. Die Expression von *mek-2-gfp* mit Hilfe des starken *tef-1*-Promotors in dem Stamm MT-37-408 (*ptef-1-mek-2-gfp*) führt zu intensiven Fluoreszenzsignalen, die eine Lokalisierung der Kinase auch in Keimlingen ermöglicht. Es wurde gezeigt, dass MEK-2-GFP in isolierten Keimlingen

cytoplasmatisch vorliegt und aus den Zellkernen ausgeschlossen ist. In interagierenden Keimlingen wird MEK-2-GFP oszillierend an die Spitzen der Interaktionspartner rekrutiert (Abschnitt 3.1.2, Abbildung 3.2) und co-lokalisiert während des *Switchings* mit der MAPK MAK-2 (Abbildung 3.4 in Abschnitt 3.1.4).

In den Stämme MT-68-553 (*pmek-2-mek-2-gfp-saax*) und MT-67-552 (*ptef-1-mek-2-gfp-saax*) wird die Kinasevariante *mek-2-gfp-saax* exprimiert. Das Genprodukt MEK-2-GFP-SAAX weist am C-Terminus eine CAAX-ähnliche Sequenz auf, die im Gegensatz zu dieser aber nicht prenyliert wird und daher keine Membranassoziation vermittelt. Die Stämme dienen daher zur Kontrolle, um mögliche sequenzbasierte Artefakte zu erkennen (Abschnitt 3.3.2). Es wurde dementsprechend für MEK-2-GFP-SAAX in den Stämmen MT-68-553 (*pmek-2-mek-2-gfp-saax*) und MT-67-552 (*ptef-1-mek-2-gfp-saax*) eine vergleichbare Lokalisation wie für MEK-2-GFP in den Stämmen MT-36-300 (*pmek-2-mek-2-gfp*) und MT-37-408 (*ptef-1-mek-2-gfp*) erwartet. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden diese Erwartungen bestätigt. Der Stamm MT-68-553 (*pmek-2-mek-2-gfp-saax*) wies in Keimlingen ein so geringes Fluoreszenzsignal auf, dass eine Lokalisation von MEK-2-GFP-SAAX nicht möglich war. In reifen Hyphen akkumuliert MEK-2-GFP-SAAX um die Septenpore (Abbildung 3.33A). Der Stamm MT-67-552 (*ptef-1-mek-2-gfp-saax*) wies dagegen eine sehr gute Fluoreszenz auf, die eine Lokalisation von MEK-2-GFP-SAAX in Keimlingen und reifen Hyphen ermöglichte. Wie erwartet lokalisiert das Fusionsprotein in reifen Hyphen um die Septenporen herum (Abbildung 3.33C). In isolierten Keimlingen liegt das Fusionsprotein cytoplasmatisch vor und ist von den Zellkernen ausgeschlossen (Abbildung 3.33E). Während der Keimlingsinteraktionen lokalisiert MEK-2-GFP-SAAX oszillierend an den Spitzen der Interaktionspartner und akkumuliert später an der Kontaktstelle zwischen den Keimlingen (Abbildung 3.34).

Die Teststämme MT-29-249 und MT-35-330 exprimieren *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des nativen bzw. des *tef-1*-Promotors. Auf Grund der CAAX-Sequenz wurde erwartet, dass MEK-2-GFP-CAAX in Keimlingen und Hyphen an der Plasmamembran lokalisiert. Diese Erwartungen wurden fluoreszenzmikroskopisch bestätigt. Der Stamm MT-29-249 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*) weist ein geringes Fluoreszenzsignal auf, das eine Detektion von MEK-2-GFP-CAAX in Keimlingen nicht ermöglicht. In reifen Hyphen lokalisiert MEK-2-GFP-CAAX an der gesamten Plasmamembran, wobei das Fluoreszenzsignal an den Septen am stärksten ist (Abbildung 3.33B).

3. Ergebnisse

Das Fluoreszenzsignal in dem Stamm MT-67-552 (*ptef-1-mek-2-gfp-saax*) ist dagegen stark genug, um in Hyphen und Keimlingen lokalisiert zu werden. In reifen Hyphen lokalisiert MEK-2-GFP-CAAX wie erwartet an der gesamten Plasmamembran und ist an den Septen am deutlichsten zu sehen (Abbildung 3.33D). In Keimlingen akkumuliert MEK-2-GFP-CAAX ebenfalls an der Membran, wobei der Bereich um die Spore häufig ausgespart bleibt (Abbildung 3.33F).

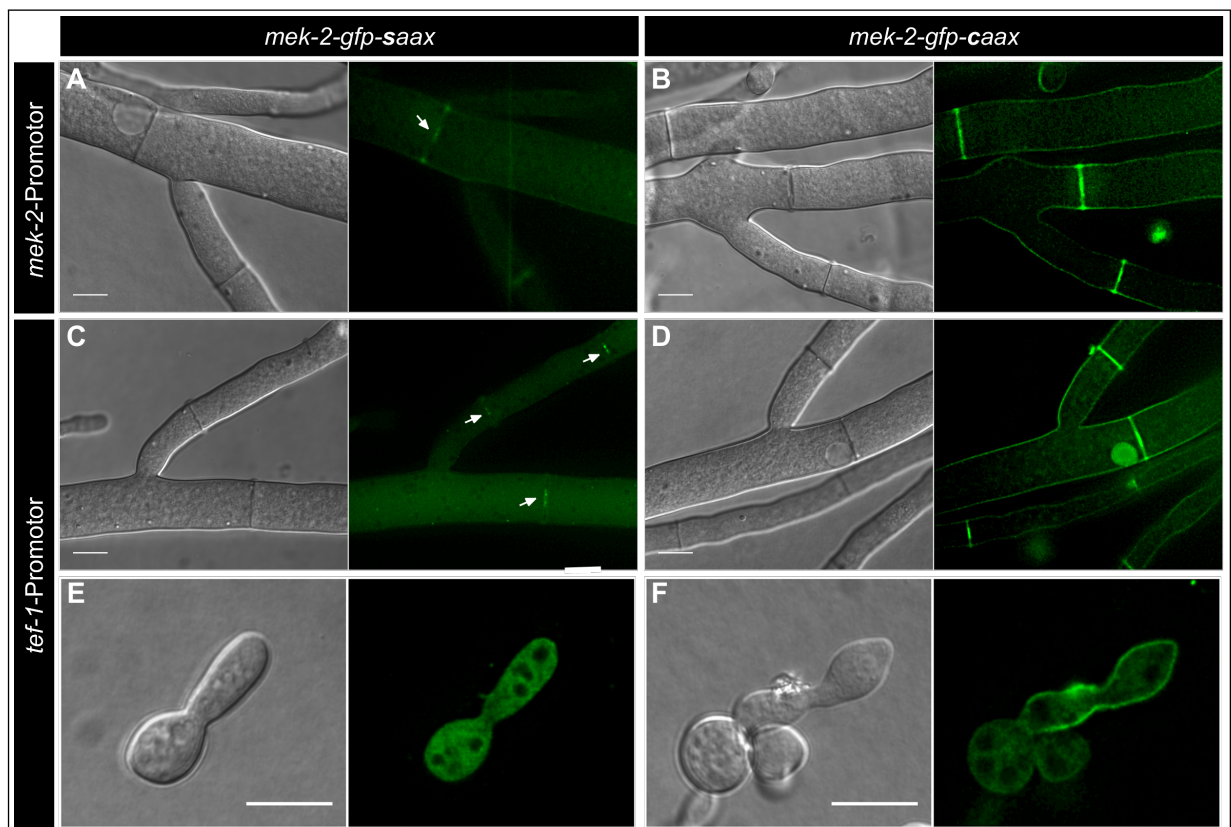


Abbildung 3.33.: Promotorabhängige Lokalisation von MEK-2-GFP-C/SAAX im Wildtyp-Hintergrund

Fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsstudien zeigen, dass MEK-2-GFP-SAAX in reifen Hyphen der Stämme A) MT-68-553 (*pmek-2-mek-2-gfp-saax*) und C) MT-67-552 (*ptef-1-mek-2-gfp-saax*) um die Septenporen akkumuliert. E) In isolierten Keimlingen des Stammes MT-67-552 (*ptef-1-mek-2-gfp-saax*) liegt MEK-2-GFP-SAAX cytoplasmatisch vor und ist aus den Zellkernen ausgeschlossen. B) MEK-2-GFP-CAAX lokalisiert in reifen Hyphen der Stämme MT-29-249 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*) und D) MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) an der gesamten Plasmamembran und ist am deutlichsten über die ganze Länge der Septen zu sehen. F) In Keimlingen des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) lokalisiert MEK-2-GFP-CAAX an der Plasmamembran, wobei das Fluoreszenzsignal im Bereich der Spore häufig abnimmt. Maßstab: 10µm.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Test- und Kontrollstämme haben die erwartete subzelluläre Lokalisation der drei untersuchten Kinasevarianten von MEK-2 bestätigt.

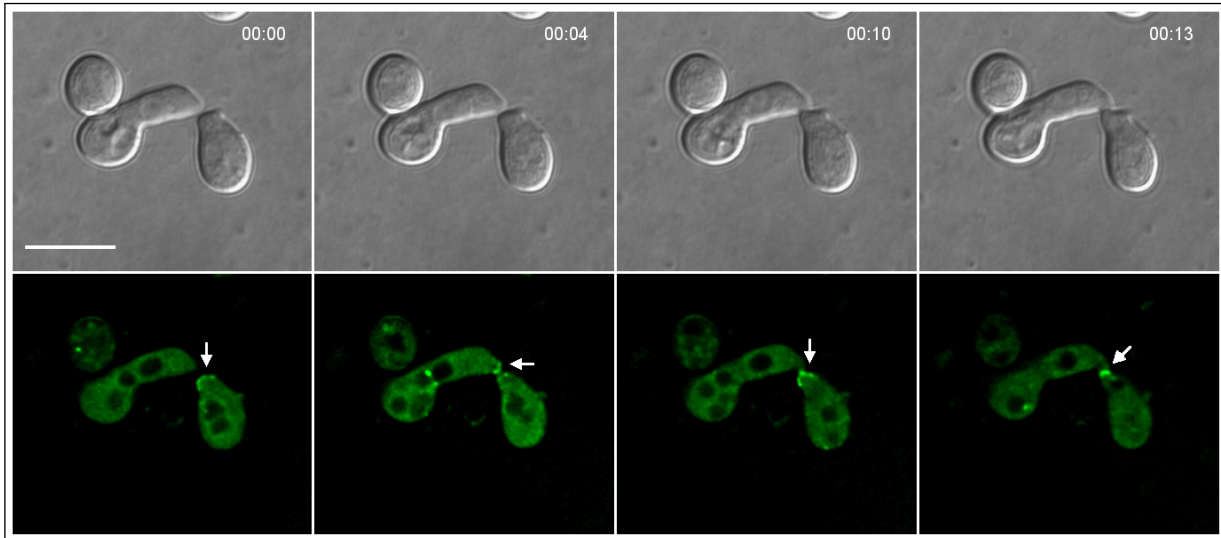


Abbildung 3.34.: Subzelluläre Lokalisation von überexprimiertem MEK-2-GFP-SAAX in interagierenden Keimlingen

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen interagierender Keimlinge des Stammes MT-67-552 (*ptef-1-mek-2-gfp-saax*) zeigen eine dynamisch oszillierende Lokalisation von MEK-2-GFP-SAAX an die Spitzen der Interaktionspartner. Nachdem die Keimlinge sich berühren akkumuliert MEK-2-GFP-SAAX an der Kontaktstelle. Maßstab: 10 μ m.

Werden die Stämme auf Agarröhrchen mit Minimalmedium inkubiert, weisen sie nach 7 Tagen Wachstum einen vergleichbaren makroskopischen Phänotyp wie der Wildtypstamm N1-01 auf (Abbildung 3.35A). Alle Stämme bilden Lufthyphen und zeigen ein typisches Sporulationsmuster, was darauf hindeutet, dass MEK-2-GFP-CAAX in Anwesenheit der nativen Kinase keinen gravierenden Einfluss auf die vegetative Entwicklung von *N. crassa* hat. Um möglicherweise vorhandene kleinere Unterschiede in der Entwicklung zwischen den *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen und den Kontrollstämmen zu untersuchen, wurden die charakteristischen phänotypischen Merkmale Längenwachstum, Sporenbildung und Lufthyphenwachstum in den Test- und Kontrollstämmen quantifiziert. Die Keimlinge der Stämme wurden auf mögliche Polaritätsdefekte untersucht und die Keimlingsinteraktionen quantifiziert.

Die Quantifizierung des Längenwachstums zeigte, dass die *mek-2-gfp*- und *mek-2-gfp-saax*-exprimierenden Stämme mit durchschnittlichen Wachstumsraten von $9,6 \pm 0,4$ cm/Tag (MT-68-553) bis $10,1 \pm 0,5$ cm/Tag (MT-36-300) vergleichbar schnell wie der Wildtyp wachsen. Dabei spielt es keine Rolle, ob *mek-2-gfp(-saax)* mit Hilfe des nativen oder des starken *tef-1*-Promotors exprimiert wird. Auch der Stamm MT-29-249 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*) zeigte mit einem durchschnittlichen Wachstum von $9,9 \pm 0,3$ cm/Tag keinen signifikanten Unter-

schied zum Wildtyp, der etwa $9,7 \pm 0,3$ cm/Tag wächst. Lediglich der Stamm MT-35-330, der *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des *tef-1*-Promotors überexprimiert, weist mit durchschnittlich $9,0 \pm 0,4$ cm/Tag im Vergleich zum Wildtyp eine sehr geringe, aber statistisch signifikante ($p \leq 0,05$) Reduktion der Wachstumsrate um etwa 7% im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 3.35B).

Die Quantifizierung der Lufthyphen zeigte das gleiche Muster: Alle untersuchten Kontrollstämme und der Teststamm MT-29-249 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*) weisen mit einer durchschnittlichen Wachstumsrate von $11,8 \pm 0,5$ mm/Tag (MT-36-300) bis $12,6 \pm 1,9$ mm/Tag (MT-29-249) keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp mit etwa $13,9 \pm 1,8$ mm/Tag auf. Der Stamm MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) bildet dagegen mit einem durchschnittlichen Wachstum von $5,9 \pm 1,4$ mm/Tag nur knapp halb so lange Lufthyphen wie der Wildtyp ($p \leq 0,001$) (Abbildung 3.35C). Die Sporenbildung ist dagegen in keinem der untersuchten Stämme signifikant verändert. Während der Wildtyp im Durchschnitt $25,1 \pm 9,1 \cdot 10^7$ Sporen pro Kulturröhrchen bildet, liegt dieser Wert bei den getesteten Stämmen zwischen $25,4 \pm 7,0 \cdot 10^7$ Sporen pro Kulturröhrchen (MT-36-300) und etwa $30,8 \pm 1,6 \cdot 10^7$ Sporen pro Kulturröhrchen (MT-37-408) (Abbildung 3.35D).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression von *mek-2-gfp-caax* im Wildtyp-Hintergrund einen geringen negativen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung von *N. crassa* hat. Da von den leichten Entwicklungsdefiziten ausschließlich der Stamm MT-35-330 betroffen ist, der *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des starken *tef-1*-Promotors überexprimiert, handelt es sich hierbei vermutlich um einen dosisabhängigen Effekt von membrangebundenem MEK-2. Viele bekannte Fusionsmutanten weisen Defizite bei der Bildung von Lufthyphen und/oder reduzierte Wachstumsraten auf ([Fu et al., 2011; Simonin et al., 2012]), daher könnten die entsprechenden Entwicklungsdefekte des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) erste Hinweise auf reduzierte Zellinteraktionen sein. Vorherige Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zudem, dass MEK-2-GFP-CAAX im *mek-2*-Deletionshintergrund spezifisch in Keimlingen zu gravierenden Polaritätsdefekten führt (Abschnitt 3.3.6). Um zu testen, ob Keimlinge des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) ebenfalls einen Polaritätsdefekt und/oder reduzierte Keimlingsinteraktionen aufweisen, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit Keimlinge dieses Stammes mikrosko-

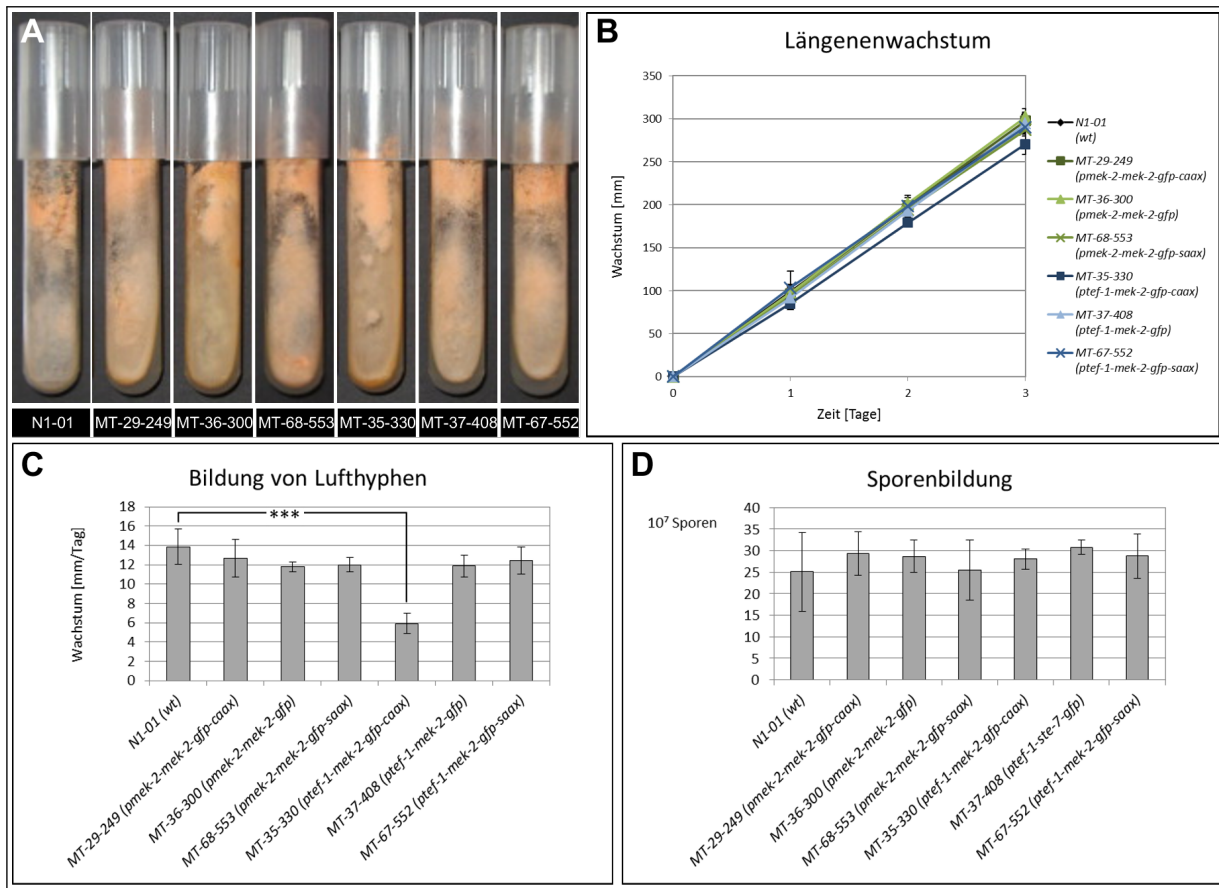


Abbildung 3.35.: Quantifizierung charakteristischer Merkmale in den Stämmen MT-29-249 und MT-35-330

In den *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen MT-29-249 (*p_{mek-2}-mek-2-gfp-caax*) und MT-35-330 (*p_{tef-1}-mek-2-gfp-caax*) und entsprechenden Kontrollstämmen wurde A) der makroskopische Phänotyp nach 7 Tagen Wachstum auf Röhren mit Minimalmedium beobachtet und B) Quantifizierungen des Längenwachstums, C) des Lufthyphenwachstums und D) der Menge gebildeter Konidien pro Kulturröhrchen durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen aus je 5 unabhängigen Experimenten.

piert, mögliche Polaritätsdefekte untersucht und die Interaktionsrate der Keimlinge bestimmt und mit den Keimlingsinteraktionsraten der Kontrollstämmen verglichen.

Um einen ersten Überblick über das Wachstumsverhalten und mögliche Polaritätsdefekte in den *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen MT-29-249 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*) und MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) zu erhalten, wurden Sporen der entsprechenden Stämme für 6 Stunden bei 30°C inkubiert, unter dem Mikroskop untersucht und mit Keimlingen der Kontrollstämmen und des Wildtyps verglichen. Keimlinge des Wildtyps (Abbildung 3.36B, linke Spalte) und der *mek-2-gfp*- und *mek-2-gfp-saax*-exprimierenden Kontrollstämmen haben zu diesem Zeitpunkt bereits zu einem großen Teil fusioniert und bilden kleine, miteinander verbundene Netzwerke (Abbildung 3.36C, D, E, G, H). Keimlinge des *mek-2-gfp-caax*-überexprimierenden Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) zeigen dagegen nur selten gerichtetes Wachstum zu einem Interaktionspartner, auch wenn sich mehrere Keimlinge in direkter räumlicher Nähe zueinander befinden. Auch nach einer zufälligen Berührung scheinen die Keimlinge regelmäßig nicht zu fusionieren, sondern setzen ihr Wachstum parallel zueinander fort (3.36F, linke Spalte). Insgesamt weisen die Keimlinge des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Zellmorphologie auf. Sie bilden seltener gerade Keimschläuche und weisen häufig ein perlenkettenförmiges Wachstum auf. Diese Wachstumsform erinnert an das apolare Wachstum von Keimlingen der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$), wobei der Effekt in Keimlingen des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) milder ausfällt. Die Keimschläuche weisen ein geringeres isotropes Wachstum auf und werden nicht dicker als die Ausgangsspore. Die Unterteilung der Keimlinge in Spore und Keimschlauch ist in diesem Stamm daher weitestgehend möglich, im Gegensatz zu Keimlingen der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) (Abbildung 3.36)F, linke Spalte). Um herauszufinden, inwieweit die Interaktionen zwischen Keimlingen der Stämme MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) und MT-29-249 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*) durch die Expression von *mek-2-gfp-caax* beeinträchtigt werden, wurden die Keimlingsinteraktionen in den Test- und Kontrollstämmen quantifiziert und miteinander verglichen.

Um die Keimlingsinteraktionen zu quantifizieren, wurden vegetative Sporen der untersuchten Stämme für 4 oder für 6 Stunden bei 30°C inkubiert und anschließend interagierende und

nicht-interagierende Keimlinge gezählt, um die Interaktionsraten zu bestimmen. Statistische Analysen zeigten, dass sich die Interaktionsraten nach 6 Stunden Inkubationszeit im Vergleich zu 4 Stunden Inkubationszeit in keinem der Stämme signifikant verändert hat. Nach 6 Stunden Inkubationszeit befinden sich durchschnittlich $96 \pm 2,1$ % der Wildtyp-Keimlinge in einer Interaktion oder sind bereits fusioniert. Die Bestimmung der Interaktionsrate von Keimlingen des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) war auf Grund der veränderten Morphologie schwierig. Durch das ungleichmäßige Wachstum konnte in manchen Fällen nicht beurteilt werden, ob es sich bei einer vorhandenen Struktur um einen ungleichmäßig gewachsenen, oder um zwei bereits fusionierte Keimlinge handelt. Für die Quantifizierung wurden daher nur eindeutig interagierende oder eindeutig nicht-interagierende Keimlinge gezählt. Durch dieses Vorgehen ist es möglich, dass die ermittelte Interaktionsrate in die eine oder andere Richtung von der tatsächlichen Interaktionsrate abweicht, falls die nicht gezählten Strukturen größtenteils nur eine der beiden Möglichkeiten (bereits fusionierte Keimlinge versus einzelne Keimlinge mit ungleichmäßig wachsenden Keimschläuchen) repräsentieren. Die hier ermittelte Interaktionsrate von Keimlingen des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) ist mit etwa $19,2 \pm 3,8$ % im Vergleich zum Wildtyp um etwa 80 % reduziert ($p \leq 0,001$). Alle anderen untersuchten Stämme weisen mit Interaktionsraten zwischen durchschnittlich $79,3 \pm 6,7$ % (MT-37-408) und $99,4 \pm 0,8$ % (MT-29-249) nach 6 Stunden Inkubationszeit keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf (Abbildung 3.36A). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Überexpression von *mek-2-gfp-caax* effiziente Keimlingsinteraktionen verhindert, während eine moderate Expression von *mek-2-gfp-caax* mit dem nativen Promotor, ebenso wie die Überexpression von *mek-2-gfp* oder *mek-2-gfp-saax* zu einem Wildtyp-ähnlichen Verhalten führen. Diese Feststellung stützt die Vermutung, dass membrangebundenes MEK-2-GFP-CAAX einen dosisabhängigen Einfluss auf die Zellpolarität in Keimlingen ausübt.

Untersuchungen der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) zeigten überraschenderweise, dass die Keimlinge einen starken Polaritätsdefekt und keine oder reduzierte Interaktionen aufweisen, während reife Hyphen polar wachsen und auch fusionieren (Abschnitt 3.3.6). Keimlinge des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) zeigen einen moderaten Polaritätsdefekt und reduzierte Interaktionen. Es wurde daher vermutet, dass reife Hyphen dieses Stammes sich von dem Polaritätsdefekt der Keimlinge erholen und im Inneren

3. Ergebnisse

der Kolonie fusionieren. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden reife Hyphen mikroskopiert und mit Hyphen des Wildtyps verglichen. Die Untersuchungen zeigten, dass Hyphenfusionen in den inneren Bereichen von Kolonien des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) stattfinden (Abbildung 3.36F, rechte Spalte), die vergleichbar aussehen wie die Hyphenfusionen des Wildtyps (Abbildung 3.36B, rechte Spalte).

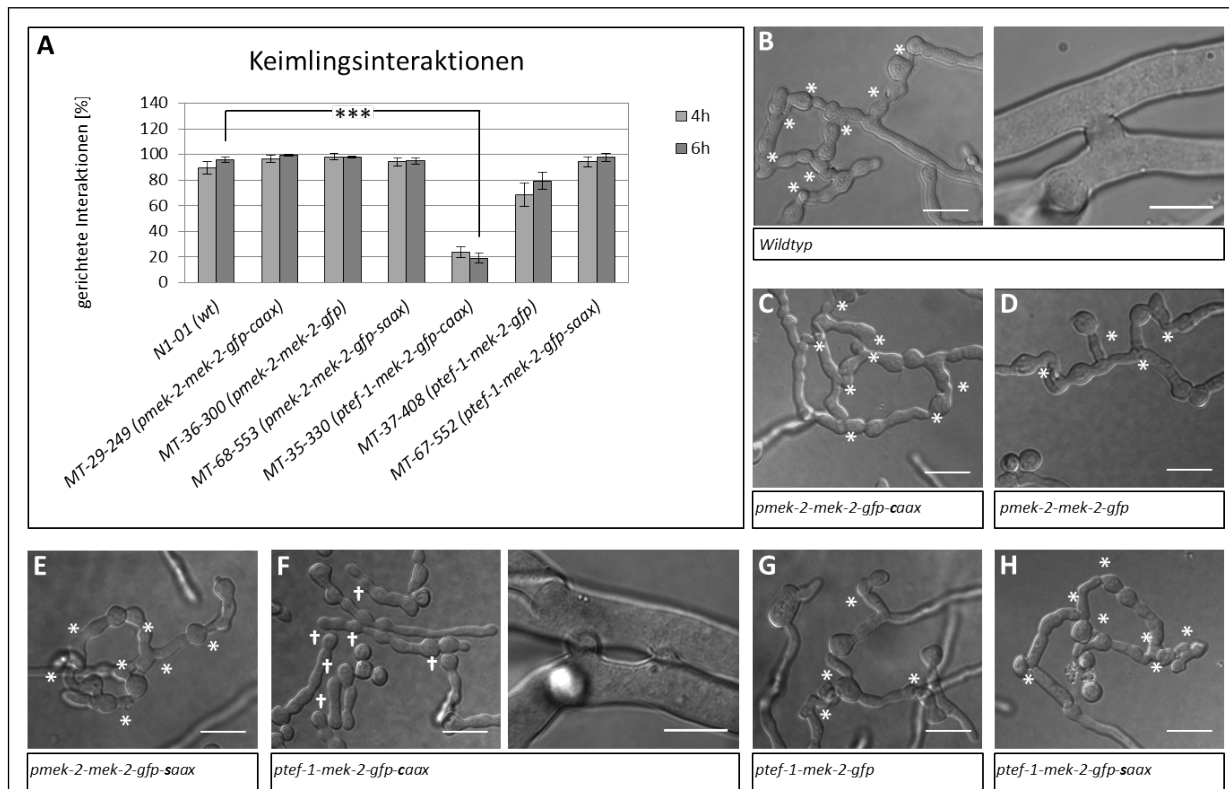


Abbildung 3.36.: Mikroskopische Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen in den Stämmen MT-29-249 und MT-35-330

A) Quantifizierung der Keimlingsinteraktionen nach 4 und 6 Stunden Inkubationszeit. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Je Experiment wurden 107 bis 182 Keimlinge gezählt. B-H) Exemplarische Bilder von interagierenden Keimlingen der Stämme N1-01 (B, linke Spalte), MT-29-249 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*) (C), MT-36-300 (*pmek-2-mek-2-gfp*) (D), MT-68-553 (*pmek-2-mek-2-gfp-saax*) (E), MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) (F, linke Spalte), MT-37-408 (*ptef-1-mek-2-gfp*) (G), MT-67-552 (*ptef-1-mek-2-gfp-saax*) (H) und von Hyphenfusionen in den Stämmen N1-01 (B, rechte Spalte) und MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) (F, rechte Spalte). Maßstab: 10µm.

3.3.8. Natives MAK-2 wird in *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen phosphoryliert

MAP-Kinasen-Module bestehen aus drei Kinasen, die sich gegenseitig in einer hierarchischen Reihenfolge von der MAPKKK bis zur MAPK phosphorylieren und damit aktivieren. In *N. crassa* ist die Aktivität der MAPK MAK-2 notwendig für die Initiierung und Aufrechterhaltung des Zeldialogs zwischen Keimlingen, der am Ende zu einem Fusionsereignis führt [Fleissner et al., 2009]. Die partielle Komplementierung des Fusionsdefekts der $\Delta mek-2$ -Mutante durch die Expression von *mek-2-gfp-caax* im Deletionshintergrund führt zu der Vermutung, dass MAK-2 in diesen Stämmen durch Phosphorylierung aktiviert wird, und dass diese Phosphorylierung von der membranverankerten Kinasenvariante MEK-2-GFP-CAAX ausgeführt wird. Die Überexpression von *mek-2-gfp-caax* führt im Wildtyp-Hintergrund zu reduzierten Keimlingsinteraktionen, was möglicherweise auf eine veränderte Aktivierung von MAK-2 im Vergleich zum Wildtyp zurückzuführen sein könnte. Um diese Vermutungen genauer zu untersuchen, wurde der Phosphorylierungsstatus von MAK-2 in einem Western-Blot getestet. Hierfür wurden Proteinhextrakte aus Schüttelkulturen der Test- und Kontrollstämmen extrahiert. In Schüttelkulturen werden wenig Zellinteraktionen erwartet, und damit einhergehend auch ein geringer Phosphorylierungsstatus von MAK-2, sodass eine mögliche Hyperphosphorylierung von MAK-2 in den Teststämmen einfach erkannt werden kann. Um aktiviertes MAK-2 nachzuweisen, wurde der Antikörper Anti-Phospho-p44/42 verwendet, der spezifisch phosphoryliertes, aber nicht unphosphoryliertes MAK-2 erkennt. Anschließend wurde der Antikörper von der Membran gewaschen und die identische Membran mit weiteren Antikörpern inkubiert. Dabei diente der Anti-GFP-Antikörper zum Nachweis der verschiedenen MEK-2-GFP(-C/SAAX)-Varianten in den Test- und Kontrollstämmen, also der *Upstream*-Kinase von MAK-2. Der Anti-Tubulin-Antikörper erkennt das als Haushaltsprotein geltende Tubulin und soll zeigen, ob in allen Proben vergleichbare Gesamtproteinmengen vorhanden sind.

Als Teststämmen wurden die Stämme MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) verwendet, die *mek-2-gfp-caax* im Wildtyp und im *mek-2*-Deletionshintergrund mit Hilfe des starken *tef-1*-Promotors exprimieren. Als Kontrollen dienten neben dem Wildtyp und der $\Delta mek-2$ -Mutante die Stämme MT-37-326 (*ptef-1-mek-2-gfp*) (Her-

stellung in Abschnitt 3.1.2), MT-67-552 (*ptef-1-mek-2-gfp-saax*) und MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp*, Δ *mek-2*), die entsprechende *mek-2-gfp(-saax)*-Konstrukte im Wildtyp- und im *mek-2*-Deletionshintergrund exprimieren. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen wurde erwartet, dass MAK-2 in allen Stämmen außer der Δ *mek-2*-Mutante zumindest basal aktiviert ist. In der Deletionsmutante N3-15 (Δ *mek-2*) wird kein phosphoryliertes MAK-2 erwartet. In den Teststämmen MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) finden im Gegensatz zur *mek-2*-Deletionsmutante Hyphenfusionen statt, sodass auch hier zumindest eine basale Aktivierung von MAK-2 erwartet wird. Die beiden Teststämme überexprimieren *mek-2-gfp-caax*, und weisen Defekte in der Entwicklung von und der Kommunikation zwischen Keimlingen auf. Eine mögliche Ursache für diese Effekte könnte eine inadäquate Aktivierung von MAK-2 zu falschen Zeitpunkten oder an falschen Orten in der Zelle sein, die aus den unphysiologischen Mengen und der permanenten Misslokalisierung von MEK-2-GFP-CAAX resultieren könnte. In diesem Fall würden wir für MAK-2 in den beiden Teststämmen eine Hyperphosphorylierung erwarten.

Die Reaktion mit dem Anti-Phospho-Antikörper zeigt, dass MAK-2 wie erwartet in allen Stämmen außer der *mek-2*-Deletionsmutante phosphoryliert vorliegt (Abbildung 3.37). Die Stärke der MAK-2- Phosphorylierung variierte dabei in den unabhängig durchgeführten Experimenten, sodass keine offensichtliche Hyperphosphorylierung von MAK-2 in den *mek-2-gfp-caax*-überexprimierenden Stämmen (Spur 5 und 7) festgestellt wurde (siehe auch [Thieme, 2014; Letz, 2014]). Die fehlende MAK-2-Phosphorylierung in der Δ *mek-2*-Mutante (Spur 2) zeigt, dass die Phosphorylierung von MAK-2 in den restlichen Stämmen durch MEK-2 bzw. die entsprechenden MEK-2-GFP(-C/SAAX)-Fusionsproteine durchgeführt wird. Die mit dem Anti-GFP-Antikörper nachgewiesenen Mengen der MEK-2-Varianten, also der *Upstream*-Kinase von MAK-2, hängen stark von der C-terminalen Sequenz ab. Während die MEK-2-GFP- und MEK-2-GFP-SAAX-Fusionsproteine intensive Banden aufweisen (Spuren 3, 4 und 6), zeigen die MEK-2-GFP-CAAX-Fusionsproteine vergleichsweise schwache Banden (Spuren 5 und 7). Diese Beobachtung deutet auf einen schnellen Abbau von membrangebundenen MEK-2 hin. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch in Western-Blots mit der membrangebundenen MAP-Kinasenvariante MAK-2-GFP-CAAX gemacht und deuten auf einen allgemeinen, destabilisierenden Einfluss der artifiziellen Membranlokalisierung auf Komponenten des MAK-2 MAP-

Kinasen-Moduls hin (Abschnitt 3.3.5). Der Wildtyp und die $\Delta mek-2$ -Mutante exprimieren keine GFP-Fusionsproteine und weisen bei der Reaktion mit dem Anti-GFP-Antikörper erwartungsgemäß keine Banden auf (Spuren 1 und 2). Die Kontrolle mit dem Anti-Tubulin-Antikörper zeigt, dass in allen Spuren vergleichbare Mengen Gesamtproteinextrakt vorhanden sind.

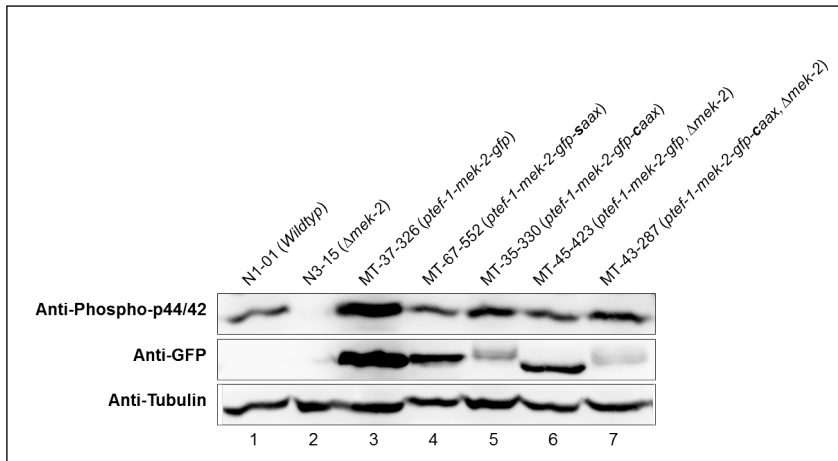


Abbildung 3.37.: Western-Analyse zur Detektion von phosphoryliertem MAK-2 in *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen

Western-Blot-Analyse von Proteinrohextrakten der Stämme N1-01 (*wt*) (Spur 1), N3-15 ($\Delta mek-2$) (Spur 2), MT-37-326 (*ptef-1-mek-2-gfp*) (Spur 3), MT-67-552 (*ptef-1-mek-2-gfp-saax*) (Spur 4), MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) (Spur 5), MT-45-423 (*ptef-1-mek-2-gfp, \Delta mek-2*) (Spur 6) und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, \Delta mek-2*) (Spur 7). Der Antikörper Anti-Phospho-p44/42 weist spezifisch phosphoryliertes MAK-2 nach. MEK-2-GFP(-C/SAAX)-Fusionsproteine werden mit dem Anti-GFP-Antikörper nachgewiesen und Tubulin mit dem Antikörper Anti-Tubulin.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass eine dynamische Lokalisation von MEK-2 zur effizienten Kommunikation zwischen Keimlingen beiträgt, aber nicht essentiell für den Prozess der Zellinteraktion und Zellfusion ist. In Keimlingen des Stammes MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax, \Delta mek-2*) finden in stark reduziertem Umfang Keimlingsfusionen statt. Keimlinge der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, \Delta mek-2*) weisen dagegen so starke Polaritätsdefekte auf, dass Keimlingsinteraktionen nicht zuverlässig bestimmt werden konnten. Es wurde aber gezeigt, dass Hyphen im Inneren der Kolonien dieser Stämme fusionieren (Abschnitt 3.3.6). Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass MAK-2 in dem Stamm MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, \Delta mek-2*) phosphoryliert vorliegt und diese Phosphorylierung höchstwahrscheinlich durch die künstlich membranverankerte MAPKK-Variante MEK-2-GFP-CAAX vermittelt wird. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der zuvor beobachteten Hyperphosphorylierung der membrangebundenen MAPK-Variante MAK-2-

GFP-CAAX. Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass die hierarchische Phosphorylierung der MAP-Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls an der Plasmamembran stattfindet. Der Stamm MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) weist stark reduzierte Keimlingsinteraktionen und einen moderaten Polaritätsdefekt der Keimlinge auf, während Keimlinge des Kontrollstamms MT-37-408 (*ptef-1-mek-2-gfp*) keine dieser Defekte aufweisen. Diese Ergebnisse deuten gemeinsam mit dem Polaritätsdefekt von Keimlingen der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) darauf hin, dass die Überexpression von *mek-2-gfp-caax* spezifisch in Keimlingen zu einem Polaritätsdefekt führt, der durch die Anwesenheit von nativem MEK-2 abgeschwächt wird.

3.3.9. MEK-2-GFP-CAAX ermöglicht eine sexuelle Differenzierung

Deletionsmutanten der Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls zeigen nicht nur bei der vegetativen, sondern auch bei der sexuellen Entwicklung Defizite. Alle drei Kinasen sind essentiell für die Bildung reifer Vorfruchtkörper, der sogenannten Protoperithezien, und die Deletionsmutanten *nrc-1*, *mek-2* und *mak-2* sind folglich weiblich steril [Pandey et al., 2004; Maerz et al., 2008; Lichius et al., 2012a]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von *mek-2-gfp-caax* die vegetativen Entwicklungsdefekte der Δ *mek-2*-Mutante partiell komplementiert, während eine Überexpression in Anwesenheit der nativen Kinase Keimlingsinteraktionen reduziert (Abschnitt 3.3.6 und 3.3.7). Um herauszufinden, ob die membrangebundene Kinasevariante MEK-2-GFP-CAAX auch während der sexuellen Entwicklung die Funktion der nativen Kinase zumindest teilweise übernehmen kann, und ob auch hier toxische Effekte sichtbar sind, wurden *mek-2-gfp-caax*-exprimierende Stämme in einer Kreuzung als weiblicher Kreuzungspartner eingesetzt. Die Entwicklung sexueller Reproduktionsstrukturen wurde vor der Befruchtung, sowie 8 und 16 Tage nach der Befruchtung stereomikroskopisch untersucht. Dabei wurde auf quantitative und qualitative Unterschiede in der Entwicklung der Test- und der Kontrollkreuzungen geachtet. Perithezien der Kreuzungen wurden aufgebrochen und die freigelegten Rosetten verglichen.

Als Teststämme für die Kreuzungen wurden die Stämme MT-43-286, MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*, *matA*) und MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, *matA*) eingesetzt. Mit den

Stämmen MT-43-286, MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*, *matA*) sollte untersucht werden, ob MEK-2GFP-CAAX die Funktionen der nativen Kinase während der sexuellen Entwicklung ganz oder teilweise übernehmen kann. Mit dem Stamm MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, *matA*) sollte getestet werden, ob MEK-2-GFP-CAAX in Anwesenheit der nativen Kinase zu toxischen Effekten führt. Da die sexuelle Entwicklung der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*, *matA*) vergleichbar verlief, werden die Kreuzungen hier exemplarisch anhand des Stammes MT-43-286 dargestellt. Auf kleinere Unterschiede in der Entwicklung wird entsprechend eingegangen. Zur Kontrolle wurden Kreuzungen mit dem Wildtyp N1-01 (*matA*) und der *mek-2*-Deletionsmutante N3-15 (Δ *mek-2*, *matA*) als weiblichen Kreuzungspartnern durchgeführt. Die Befruchtung der jeweiligen Kreuzungsplatten erfolgte mit Sporensuspensionen des Wildtyp-Stamms N1-02 (*matA*) (MT-43-286, N1-01) bzw N1-01 (*matA*) (N3-15) oder mit dem *his*-auxotrophen Wildtyp-Stamm N1-04 (*his-3*, *matA*) (MT-43-286, N1-01). Da bei der Verwendung der unterschiedlichen männlichen Kreuzungspartner keine Unterschiede in der Entwicklung der weiblichen Reproduktionsstrukturen erwartet oder beobachtet wurden, wurden die Ergebnisse entsprechend zusammengefasst.

Sporen der weiblichen Kreuzungspartner wurden auf einem Westergaard's-Kreuzungsmedium inokuliert und die Platten bei 27°C und einem wechselnden Tag/Nacht-Rhythmus inkubiert. Nach 7 Tagen wurden die Platten stereomikroskopisch untersucht. Der Stamm N1-01 (*matA*) hat gleichmäßig über die Platte verteilt Protoperithezien gebildet (Tag 0, Abbildung 3.38A, dritte Spalte), ebenso wie der Stamm MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, *matA*) (Abbildung 3.38A, zweite Spalte). Auf den Kreuzungsplatten des Stammes MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*, *matA*) befinden sich nur wenige Protoperithezien-ähnliche Strukturen, die deutlich kleiner als die des Wildtyps sind (Abbildung 3.38A, erste Spalte). Die Δ *mek-2*-Mutante bildet wie erwartet keine sichtbaren Vorfruchtkörper (Abbildung 3.38A, vierte Spalte). Im Anschluss an diese Untersuchung wurden alle Stämme mit Sporensuspensionen von Wildtyp-Stämmen des entgegengesetzten Paarungstyps befruchtet.

8 Tage nach der Befruchtung haben der Stamm MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, *matA*) und der Wildtyp N1-01 (*matA*) viele dunkle Perithezien gebildet, die eine gleichmäßige Birnenform aufweisen. Die Perithezien haben bereits erste Askosporen entlassen, die im Deckel der Kreuzungsplatten beobachtet werden können. Die Anzahl der Askosporen, die von dem Stamm

MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, matA*) entlassen werden, ist im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Der Stamm N3-15 (Δ *mek-2, mata*) hat dagegen wie erwartet keine Perithezien gebildet oder Askosporen entlassen. Der Stamm MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, Δ mek-2, matA*) weist im Vergleich zum Wildtyp nur wenige, Perithezien-ähnliche Strukturen auf, die eine runde Form haben, nur schwach melanisiert sind und teilweise bereits gut sichtbare Ostiolen gebildet haben. In drei von vier unabhängig durchgeführten Kreuzungen wurden zu diesem Zeitpunkt noch keine Askosporen entlassen. Lediglich in einer der Kreuzungen wurden 8 Tage nach der Befruchtung Askosporen in dem Deckel der Kreuzungsplatte entdeckt, die im Vergleich zum Wildtyp oder dem Stamm MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, matA*) in der Anzahl reduziert waren (Abbildung 3.38B). 15 Tage nach der Befruchtung weisen die Kreuzungsplatten des Wildtyps und des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, matA*) stark melanisierte Perithezien auf. Die Hälse der Perithezien sind klar definiert und nach oben gerichtet, wodurch es zu der typischen Birnenform kommt. Im Deckel der Kreuzungsplatten befinden sich Askosporen, wobei die Anzahl im Stamm MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, matA*) im Vergleich zum Wildtyp geringer ist. Der Stamm MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, Δ mek-2, matA*) hat nun ebenfalls melanisierte Perithezien gebildet, von denen viele sich morphologisch von den Perithezien des Wildtyps unterscheiden. Im Deckel der Kreuzungsplatten befinden sich auch Askosporen, deren Anzahl im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist. Der *mek-2*-Deletionsstamm bildet wie erwartet keine Perithezien und keine Askosporen (Abbildung 3.38C).

Umfangreiche stereomikroskopische Untersuchungen von Perithezien der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, Δ mek-2, matA*) wurden durchgeführt, um die ungewöhnliche Morphologie genauer zu charakterisieren. Im Vergleich zum Wildtyp wurden dabei 4 Hauptunterschiede ersichtlich, die beliebig untereinander kombiniert werden. 15 Tage nach der Befruchtung sind die Hälse der Perithezien in den Stämmen MT-43-286 und MT-43-287 breiter und runder als die Hälse des Wildtyps. Diese Beobachtung tritt bei dem Stamm MT-43-287 stärker in Erscheinung als bei dem Stamm MT-43-286 und ist 19 Tage nach der Befruchtung in beiden Stämmen weniger ausgeprägt als noch einige Tage zuvor (3.39A und B). Eine weitere Beobachtung, die in dem Stamm MT-43-287 ausgeprägter zu sein scheint als in dem Stamm MT-43-286, ist eine reduzierte Melanisierung. Es werden häufig Perithezien beobachtet, die hellbraun gefärbt sind und nicht die fast schwarze Farbe der Wildtyp-Perithezien

aufweisen. Dieser Effekt ist 19 Tage nach der Befruchtung weniger deutlich. Ein auffälliger Unterschied, der in den Stämmen MT-43-286 und MT-43-287 vergleichbar häufig auftritt, ist die vermehrte Bildung von Perithezien mit zwei oder mehr Hälse. Des Weiteren bilden die beiden *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämme häufig Hälse, die zur Seite oder in Richtung Agar zeigen, statt sich wie die Hälse von Wildtyp-Perithezien nach oben zu richten (3.39A). Dieser morphologische Unterschied ist 19 Tage nach der Befruchtung noch deutlicher. Zu diesem Zeitpunkt werden auch in den Stämmen MT-43-286 und MT-43-287 vermehrt Askosporen entlassen, die aufgrund der seitlichen Hälse in den Agar geschossen werden und dort als schwarze Punkte auffallen (Abbildung 3.39B).

20 Tage nach der Befruchtung mit dem männlichen Kreuzungspartner wurden Perithezien des Wildtyps und des Stammes MT-43-86 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*, *matA*) aufgebrochen und die Askosporen-enthaltenden Rosetten freigelegt. Die Perithezien des Wildtyps enthalten Rosetten, bestehend aus vielen Asci, die weiße und schwarze Askosporen beinhalten. Die Perithezien des Stammes MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*, *matA*) enthalten dagegen Rosetten, die kleiner sind als die des Wildtyps und sich aus weniger Asci zusammensetzen. Entsprechend ist die Anzahl der vorhandenen Askosporen kleiner, wobei auch hier schwarze und weiße Askosporen vorkommen (Abbildung 3.38D). Um einen Gesamtüberblick über die Menge der gebildeten Perithezien zu erhalten, wurden die Kreuzungsplatten nach 15 bis 20 Tagen fotografiert. Es ist klar zu erkennen, dass der Stamm MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, *matA*) und der Wildtyp viele Perithezien bilden, sodass die Platte dunkel gefärbt ist. Die Kreuzungsplatte des Stammes MT-43-386 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*, *matA*) weist dagegen nur wenige dunkle Punkte auf, wobei es sich um gebildete Perithezien handelt. Der Stamm N3-15 (Δ *mek-2*, *mata*) hat wie beschrieben keine Perithezien gebildet und weist daher keine schwarzen Punkte auf (Abbildung 3.38E).

Protoperithezien sind komplexe Strukturen, die aus mindestens 14 verschiedenen Zelltypen bestehen [Bistis et al., 2003]. Während die morphologischen Schritte der weiblichen Differenzierung in *N. crassa* ausführlich beschrieben wurden, ist wenig über die genetische Regulierung dieses Prozesses bekannt. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass mindestens 9 unterschiedliche Signaltransduktionswege bei der Regulierung beteiligt sind, darunter alle drei in *N. crassa* vorhandenen MAP-Kinasen-Module [Chinnici et al., 2014]. Interessanterweise sind fast alle

3. Ergebnisse

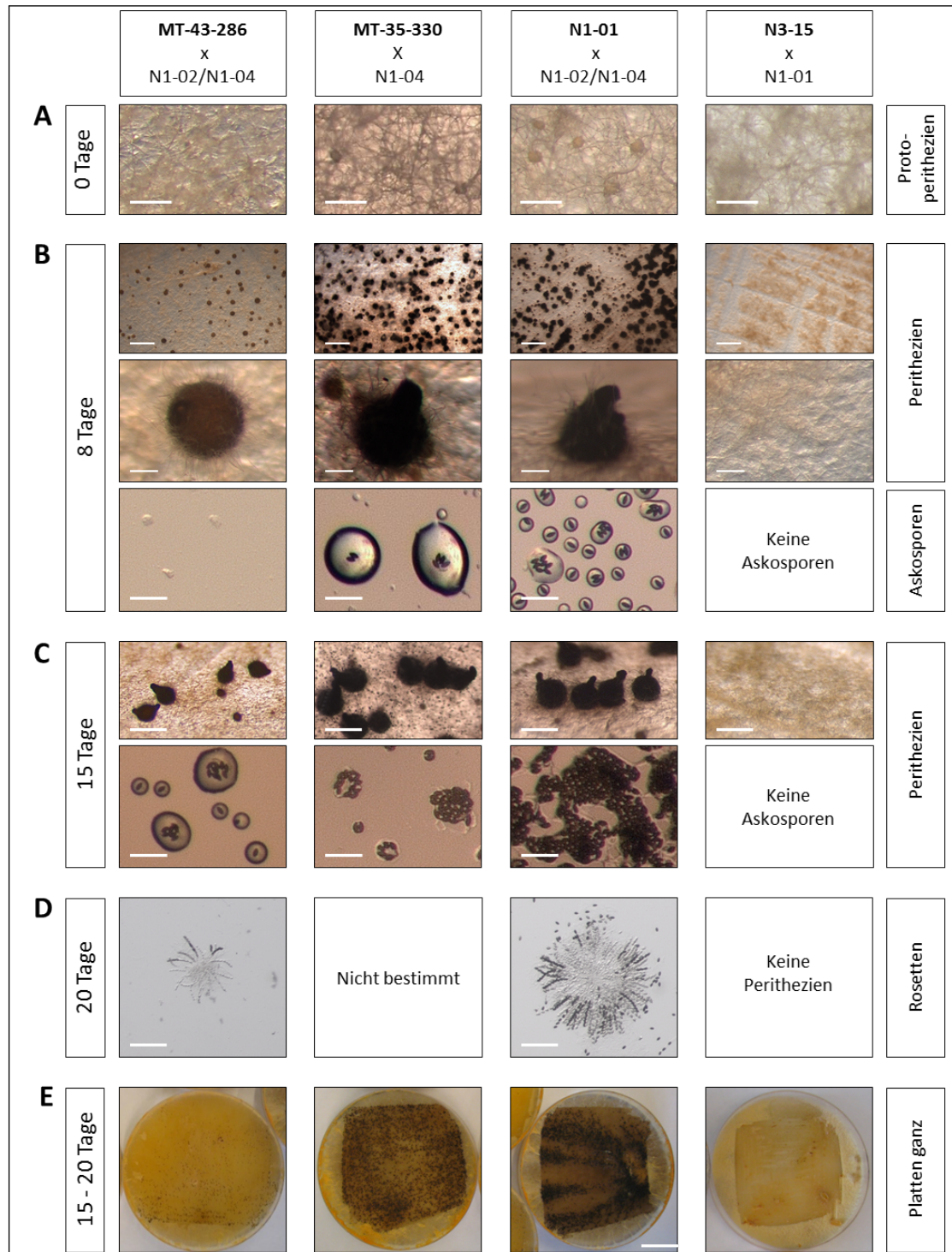


Abbildung 3.38.: Beobachtung der sexuellen Entwicklung der Stämme MT-43-286 und MT-35-330

Die sexuelle Entwicklung der Stämme MT-43-286 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*, *matA*) und MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, *matA*) als weiblicher Kreuzungspartner wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen stereomikroskopisch beobachtet und mit der Entwicklung des positiven Kontrollstamms N1-01 (*matA*) und des negativen Kontrollstamms N3-15 (Δ *mek-2*, *matA*) verglichen. Die Entwicklung wurde kurz vor der Befruchtung mit Sporen der Stämme N1-01 (*matA*), N1-02 (*matA*) oder N1-04 (*his-3*, *matA*) (A) und 8 Tage (B), 15 Tage (C) und bis zu 20 Tage (D und E) danach dokumentiert. Die Maßstäbe betragen: 0,5 mm (A und C obere Zeile), 2 mm (B obere Zeile), 0,2 mm (B mittlere Zeile und D), sowie 0,1 mm (B untere Zeile).

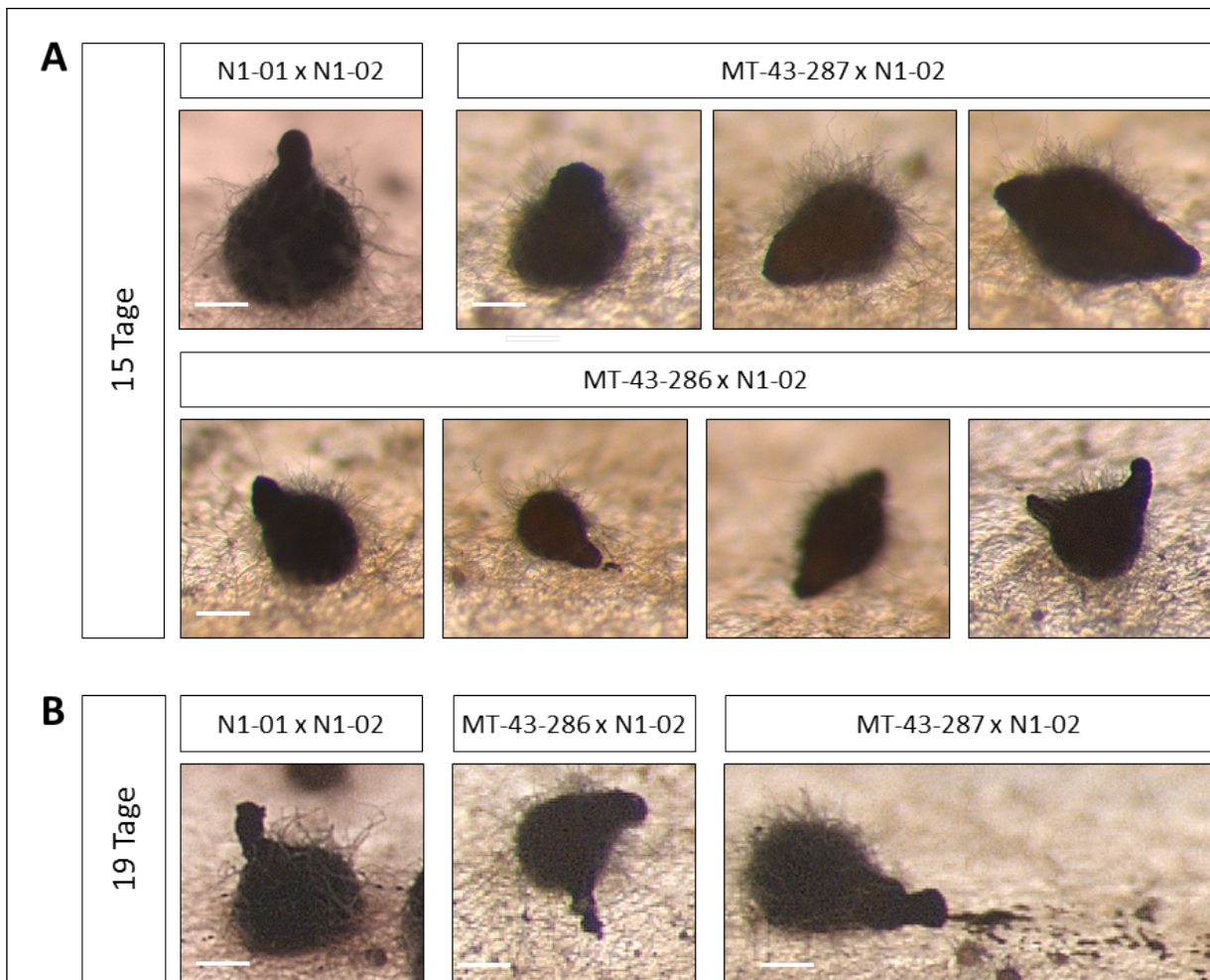


Abbildung 3.39.: Beobachtung morphologisch veränderter Perithezien nach 15 und 19 Tagen Inkubationszeit

Perithezien der weiblichen Kreuzungspartner MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*, *matA*) wurden 15 Tage (A) und 19 Tage (B) nach der Befruchtung mit Sporen des Stammes N1-02 (*matA*) stereomikroskopisch untersucht und mit Perithezien des Wildtyp-Stamms N1-01 (*matA*) verglichen. Maßstab: 0,2mm.

in *N. crassa* bekannten weiblich sterilen Mutanten völlig fertil, wenn sie in einer Kreuzung als männlicher Partner eingesetzt werden. Das gilt auch für die Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls. Kreuzungen, bei denen der Wildtyp als weiblicher und Sporen der Deletionsmutanten der jeweiligen MAP-Kinasen als männlicher Kreuzungspartner eingesetzt werden, entwickeln sich normal und generieren normale Askosporen, obwohl sexuelle Fusionsereignisse für diesen Prozess essentiell sind. Der lethale Phänotyp von Askosporen, die Deletionen der jeweiligen MAP-Kinase aufweisen, ist daher vermutlich auf keine Beeinträchtigung der sexuellen Entwicklung zurückzuführen, sondern wird zu den vegetativen Entwicklungsdefiziten der Deletionsmutanten gezählt. Der Askospor-lethale Phänotyp ist dadurch gekennzeichnet, dass die

Askosporen nicht keimen und daher keine Nachkommen aus den entsprechenden Kreuzungen gewonnen werden können [Pandey et al., 2004; Maerz et al., 2008; Lichius et al., 2012a]. Um die verschiedenen Funktionen der MAP-Kinasen in verschiedenen Entwicklungsstadien von *N. crassa* genauer zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die membrangebundenen Versionen der MAPKK MEK-2 und der MAPK MAK-2 den Askospor-lethalen Defekt des Deletionsstamms aufheben können.

Um die Keimfähigkeit von *mek-2-gfp-caax* bzw. *mak-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen zu untersuchen, wurden heterozygote Kreuzungen durchgeführt, in denen der Wildtyp N1-02 (*matA*) bzw. N1-01 (*matA*), je nach dem benötigten Paarungstyp des männlichen Partners, als weiblicher Kreuzungspartner eingesetzt wurde. Als männlicher Kreuzungspartner dienten die Stämme MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*, *matA*) und MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, Δ *mak-2*, *matA*). Zur Kontrolle wurden außerdem homozygote Kreuzungen mit zwei Wildtyp-Stämmen entgegengesetzten Paarungstyps durchgeführt, und Kreuzungen mit den Δ *mek-2*- und Δ *mak-2*-Stämmen N3-15 und 599 als jeweils männlichen Partnern in heterozygoten Kreuzungen mit dem Wildtyp. Das Keimen der erhaltenen Askosporen sollte im Anschluss auf Medium mit und ohne Hygromycin-Zugabe untersucht werden, wobei Hygromycin der Selektionsmarker der Deletionsmutanten ist. Da die Deletionen von *mak-2* oder *mek-2* bekanntermaßen zu einem Askospor-lethalen Phänotyp führen [Pandey et al., 2004; Maerz et al., 2008] und Hygromycin das Wachstum des Wildtyps verhindert, wurden noch positive Kontrollkreuzungen mit der Δ *erg-2* Mutante N2-35 als männlichen und dem Wildtyp als weiblichen Kreuzungspartner durchgeführt. Diese Mutante besitzt ebenfalls eine Hygromycin-Resistenz und es wurde zuvor berichtet, dass die Deletion von *erg-2* keinen Einfluss auf die Keimung der Askosporen hat [Weichert et al., 2016]. Etwa 200 hitzeaktivierte Askosporen der jeweiligen Kreuzungen wurden auf Platten mit BDES-Medium und mit BDES-Medium mit Hygromycin ausplattiert, wobei durch die Zugabe von Hygromycin auf die jeweiligen Deletionsmutanten selektiert wird. Das BDES-Medium führt durch eine hohe Osmolarität zu kolonieartigem Wachstum, sodass keimende Askosporen einzelne Kolonien bilden, die nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C leicht gezählt werden können. Dabei wird davon ausgegangen, dass jede Kolonie auf eine gekeimte Askospore zurückzuführen ist.

Es wurde dabei erwartet, dass auf den BDES-Platten der Wildtyp und der $\Delta erg-2$ -Kreuzungen nahezu alle Askosporen auskeimen, während in den $\Delta mek-2$ - und $\Delta mak-2$ -Kreuzungen etwa die Hälfte der Askosporen auskeimen, die das Wildtyp-Allel der jeweiligen MAP-Kinase besitzen. Auf dem Selektionsmedium mit Hygromycin wurde für die Askosporen der homozygoten Wildtyp-Kreuzung kein Wachstum erwartet, da die entsprechenden Askosporen keine Hygromycin-Resistenz aufweisen. Askosporen der $\Delta mek-2$ - und $\Delta mak-2$ -Kreuzungen tragen zwar das Hygromycin-Resistenzgen wenn sie die Deletion der MAP-Kinase besitzen, allerdings wird hierdurch gleichzeitig auf den Askospor-lethalen Phänotyp der Ausschaltmutante selektiert, sodass hier ebenfalls kein Wachstum erwartet wird. Die Deletion von *erg-2*, die ebenfalls mit einer Hygromycin-Resistenz einhergeht, beeinflusst das Keimen der Askosporen dagegen nicht. es wird also erwartet, dass die Hälfte der Askosporen, also alle die die *erg-2*-Deletion tragen, auf BDES mit Hygromycin auskeimen.

Diese Erwartungen wurden experimentell bestätigt. Auf BDES-Medium ohne Selektionszusatz keimen durchschnittlich $133 \pm 10,2$ Askosporen der Wildtyp-Kreuzung und 113 ± 18 Askosporen der $\Delta erg-2$ -Kreuzung. Mit durchschnittlich $62 \pm 9,7$ (N1-01 x N3-15) bis $82 \pm 4,1$ (N1-01 x 599) Kolonien pro Platte keimen in den Kreuzungen der $\Delta mek-2$ - und $\Delta mak-2$ -Stämme wie erwartet etwa die Hälfte der Askosporen. In einem ähnlichen Bereich befinden sich auch die Kreuzungen der Teststämme MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$, *matA*) und MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$, *mata*), in denen durchschnittlich $66 \pm 12,7$ bzw. $52 \pm 9,7$ Askosporen je Platte mit BDES-Medium keimen. Diese Werte deuten darauf hin, dass der Askospor-lethale Phänotyp der Deletionsmutanten durch die Expression der jeweiligen membrangebundenen Kinasevariante nicht komplementiert wird. Die Auszählungen der Kolonien auf Platten mit BDES und dem Hygromycin-Selektionsmarker zeigten aber, dass von den Kreuzungen des Stammes MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$, *matA*) etwa $11 \pm 4,9$ Askosporen pro Platte keimen, was im Vergleich zu den Platten ohne Hygromycin-Zusatz knapp unter 20% beträgt. Im Gegensatz dazu keimen von den Askosporen der $\Delta erg-2$ -Kreuzung auf den BDES-Platten mit Hygromycin etwa $62 \pm 8,8$ Askosporen, was im Vergleich zu den Platten ohne Hygromycin-Zusatz etwas über 50 % entspricht und somit die Erwartungen erfüllt. Die Askosporen aller anderen Kreuzungen keimen auf den Platten mit Hygromycin-Zusatz nicht (Abbildung 3.40). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von

3. Ergebnisse

mek-2-gfp-caax den Askospor-lethalen Phänotyp der $\Delta mek-2$ -Mutante partiell komplementiert, während die membrangebundene Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX die Aufgaben der nativen Kinase auch während der Keimung der Askosporen nicht übernehmen kann.

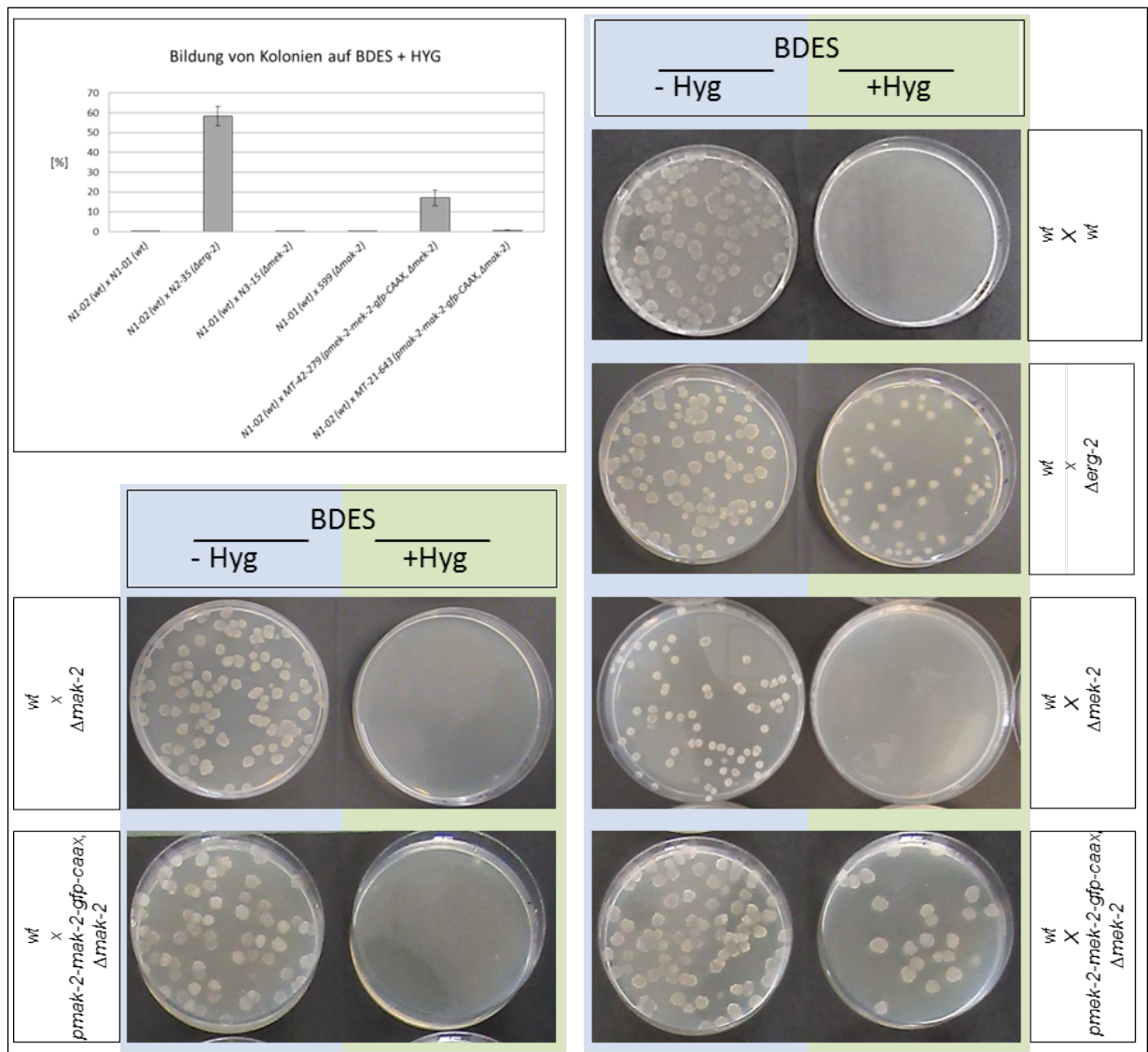


Abbildung 3.40.: Keimung von *mak-2-gfp-caax* und *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Askosporen
Askosporen der angegebenen Kreuzungen wurden hitzeaktiviert und bei 30°C auf Platten mit BDES oder BDES mit Hygromycin inkubiert. Nach 2 Tagen können die gebildeten Kolonien gezählt werden, die etwa der Anzahl gekeimter Askosporen entsprechen. Die Anzahl gekeimter Askosporen auf BDES mit Hygromycin in Relation zu der Anzahl gekeimter Askosporen auf BDES wurde für die jeweiligen Kreuzung in einem Diagramm dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten

4. Diskussion

4.1. Lokalisation von Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade

Die Keimlingsfusion in *N. crassa* ist ein bilaterales System, in dem zwei interagierende Keimlinge gerichtet aufeinander zuwachsen. Da während dieses Prozesses beide Interaktionspartner ihre Wachstumsrichtung aneinander anpassen, wird davon ausgegangen, dass auch beide Partner ein unbekanntes chemotropes Signal senden und empfangen. Eine Besonderheit bei der Keimlingsfusion von *N. crassa* ist, dass die interagierenden Zellen potentiell genetisch identisch sind und sich in einem ähnlichen Entwicklungsstadium befinden. Daher wird erwartet, dass beide Zellen einen identischen Chemoattraktanten sekretieren, der in beiden Zellen an identischen Rezeptoren bindet. Aus diesen Annahmen resultierte die Frage, wie die Zellen ihren Interaktionspartner wahrnehmen und gleichzeitig eine Selbststimulation verhindern können. Einen Erklärungsansatz für diese zentrale Frage bietet das Modell des „Zelldialogs“, und erweitert damit unser Verständnis eukaryotischer Zellfusionen. In diesem Modell wechseln interagierende Keimlinge schnell zwischen zwei physiologischen Zuständen, die mit dem Senden und dem Empfangen eines vorhergesagten Chemoattraktanten in Verbindung gebracht werden. Die Zellen befinden sich während ihres „Dialogs“ also abwechselnd in einem von zwei unterschiedlichen Modi, in dem sie entweder nur „Reden“ (Signal senden) oder nur „Zuhören“ (Signal empfangen). Die Basis für das Modell des „Zelldialogs“ bildet die Beobachtung, dass die Proteine SO und MAK-2 in interagierenden Keimlingen gegenläufig an den Spitzen der Keimlinge oszillieren [Fleissner et al., 2009; Fleissner and Serrano, 2016]. Die Beobachtung dieser subzellulären Dynamik wurde erst durch die Nutzung moderner, zeitauflösender Fluoreszenzmikroskopie im lebenden Organismus möglich [Stephens and Allan, 2003; Hickey et al., 2002; Freitag et al., 2004].

4.1.1. Die Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls oszillieren synchron an die Spitzen interagierender Keimlinge

Das Beispiel des „Zelldialog“-Modells zeigt, dass die subzelluläre Lokalisation eines Proteins Hinweise auf seine Funktion oder Funktionsweise geben kann, und wie moderne Mikroskopie-Techniken zu unserem Verständnis von biologischen Vorgängen beitragen können. Obwohl das Modell des „Zelldialogs“ wichtige Ansatzpunkte liefert, um die Mechanismen der Zellkommunikation in *N. crassa* zu verstehen, sind die molekularen Abläufe und die Regulation dieser Prozesse noch nicht vollständig verstanden. Analog zu dem gut untersuchten Zellfusions-Modell in der Hefe *S. cerevisiae* während des *Matings* spielt in *N. crassa* die MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade eine bedeutende Rolle bei der intrazellulären Signalweiterleitung (Abschnitt 1.2 und [Fleissner and Serrano, 2016]). Neben der Frage, wie das MAK-2 MAP-Kinasen-Modul aktiviert wird, stand zu Beginn dieser Arbeit die zentrale Frage im Raum, wo die Aktivierung der Kinasen stattfindet. Die oszillatorische Rekrutierung von MAK-2 an die Spitzen interagierender Keimlinge deutete darauf hin, dass eine Aktivierung der Kinasen analog zur Hefe an der Plasmamembran stattfinden könnte [Fleissner et al., 2009]. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit zunächst durch *Live Cell Imaging*-Experimente unterstützt, in denen gezeigt wurde, dass die MAPKK MEK-2 in interagierenden Keimlingen zeitgleich mit MAK-2 oszilliert und beide Kinasen dabei in gemeinsamen Komplexen an der Plasmamembran vorliegen. Obwohl die Fluoreszenzsignale von NRC-1-GFP in Keimlingen sehr gering sind, deuten die Untersuchungen darauf hin, dass NRC-1 möglicherweise auch eine oszillierende Dynamik während der Zell-Zell-Interaktion aufweist. Die mit diesen Ergebnissen unterstützte Vermutung, dass alle drei Kinasen der untersuchten MAP-Kinasen-Kaskade in einem Komplex an die Plasmamembran rekrutiert und von dort wieder entlassen werden, wird weiterhin durch die Identifizierung des Gerüstproteins HAM-5 während der Entstehung dieser Arbeit in zwei unabhängigen Studien unterstützt [Jonkers et al., 2014; Dettmann et al., 2014].

In einem ersten Ansatz wurde in einer Studie von Jonkers et al. [2014] das Phosphoproteom einer *mak-2^{Q100G}*-exprimierenden $\Delta mak-2$ -Mutante mit und ohne Zugabe eines Inhibitors verglichen, der spezifisch die Aktivität der MAK-2^{Q100G}-Kinasevariante blockiert. Dabei wurde HAM-5 als potentiell Substrat von MAK-2 identifiziert, wobei auch indirekte Effekte möglich sind. Mu-

tationen einer vorhergesagten MAK-2-Konsensus-Phosphorylierungsstelle in HAM-5, die eine Phosphorylierung entweder verhindern (HAM-5^{S506A}) oder vortäuschen sollten (HAM-5^{S506E}), hatten in interagierenden Keimlingen keinen Einfluss auf die Funktion der HAM-5-Varianten. Es wurde aber gezeigt, dass HAM-5 in interagierenden Keimlingen zeitgleich mit MAK-2, MEK-2 und NRC-1 oszilliert. Die Vermutung, dass HAM-5 als Gerüstprotein der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade funktioniert wird weiterhin durch die Beobachtung unterstützt, dass HAM-5 für die Lokalisation von MAK-2 und MEK-2 in Punkten an der Plasmamembran nicht-interagierender Keimlinge notwendig ist, während HAM-5 diese Lokalisation unabhängig von MAK-2 aufweist [Jonkers et al., 2014]. In der Hefe *S. cerevisiae* lokalisiert das Gerüstprotein Ste5 nach einer Pheromonbehandlung der Zellen an der Plasmamembran an der Spitze der gebildeten *Shmoos*. Diese Membranlokalisation ist unabhängig von den Kinasen Ste11 (MAPKKK) und Ste7 (MAPKK), da sie auch in den *ste11Δ* und *ste7Δ* Mutanten beobachtet wird [Pryciak and Huntress, 1998]. Gemeinsam deuten diese Ergebnisse nicht nur darauf hin, dass in *N. crassa* HAM-5 die subzelluläre Lokalisation von MAK-2 und MEK-2 beeinflusst, sondern auch darauf, dass die basale Sekretion eines chemotropen Signals unabhängig von der Kinaseaktivität von MAK-2 stattfinden könnte (oder Zellen sich bereits vor der Entwicklung einer Fusionskompetenz in dem Modi „Zuhören“ befinden). Um diese Möglichkeit genauer zu untersuchen, ist das mit SO interagierende Protein SIP-1 ein interessanter Kandidat. Dieses Protein weist eine bisher einzigartige subzelluläre Lokalisation auf. In Keimlingen lokalisiert es oszillierend im Cytoplasma und an der wachsende Spitze - und zwar unabhängig davon, ob die Keimlinge sich in einer Interaktion befinden, oder nicht [Schumann, persönliche Mitteilung]. Im Einklang mit der Vermutung, dass SO eine Rolle beim Senden eines chemotropen Signals spielt, weist die Dynamik von SIP-1 darauf hin, dass das Protein eine Rolle bei der Initiierung des „Zelldialogs“ spielen könnte. Weitere Untersuchungen von SO und SIP-1 könnten Aufschluss über den Mechanismus der Sekretion des unbekannten Chemoattraktanten geben und möglicherweise Einblicke in die Initiierung des „Zelldialogs“ geben. Von besonderem Interesse wäre es in diesem Zusammenhang, sich die Lokalisation von HAM-5 und MAK-2 in *Δsip-1*-Mutanten anzuschauen, in der keine Keimlingsinteraktionen stattfinden. Eine Misslokalisation dieser Proteine wäre ein erster Hinweis darauf, dass SIP-1 eine Rolle bei der Initiierung des „Zelldialogs“ spielen könnte.

In einem zweiten unabhängigen Ansatz wurden in der Studie von Dettmann et al. [2014] Affinitätsaufreinigungen der drei Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls mit Massenspektrometrie verbunden. Dabei wurde HAM-5 als Gerüstprotein für die drei Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls vorgeschlagen und das Protein STE-50 als Adapter zwischen HAM-5 und der MAPKKK NRC-1. In Co-Immunopräzipitations-Experimenten wurde bestätigt, dass HAM-5 und die drei Kinasen in einem Komplex mit STE-50 vorliegen [Dettmann et al., 2014]. In Abwesenheit von HAM-5 konnten dagegen weder NRC-1 noch MEK-2 mit MAK-2 co-präzipitiert werden [Jonkers et al., 2014; Dettmann et al., 2014]. Dennoch liegt MAK-2 in Hyphen und Keimlingen der $\Delta ham-5$ -Mutante noch phosphoryliert vor, wenn auch in reduziertem Umfang im Vergleich zum Wildtyp [Aldabbous et al., 2010; Jonkers et al., 2014; Dettmann et al., 2014]. In $\Delta mek-2$ oder $\Delta nrc-1$ -Stämmen weist MAK-2 dagegen keine Phosphorylierung auf [Pandey et al., 2004; Dettmann et al., 2012]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Signaltransduktion der MAP-Kinasen-Kaskade im $\Delta ham-5$ -Hintergrund nicht vollständig unterbrochen ist [Aldabbous et al., 2010]. Während der Signalweiterleitung phosphorylieren die Kinasen sich vermutlich sequentiell, was auf eine direkte Interaktion zwischen den Kinasen schließen lässt. Im Einklang mit dieser Vermutung interagieren die Kinasen NRC-1 und MEK-2, sowie MEK-2 und MAK-2 in *Yeast-Two-Hybrid*-Experimenten miteinander [Dettmann et al., 2012]. Diese Interaktionen sind vermutlich transient, da die Kinasen in Abwesenheit des Gerüstproteins HAM-5 nicht co-präzipitieren. Gemeinsam unterstützen die Daten der Co-Lokalisierungsexperimente in dieser Arbeit und die Identifizierung des Gerüstproteins HAM-5 ein Modell, in dem die Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls während der Zell-Zell-Kommunikation gemeinsam an die Plasmamembran rekrutiert werden und dort eine Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade durch noch unbekannte Faktoren stattfindet (Abschnitt 3.1.4 und [Jonkers et al., 2014; Dettmann et al., 2014]).

4.1.2. Die Genexpression von *nrc-1* und *mek-2* wird vermutlich auf unterschiedlichen Ebenen reguliert

In dieser Arbeit war die oszillatorische Rekrutierung der MAPKKK NRC-1 in interagierenden Keimlingen nur schwer zu erkennen. Zum einen könnte dies an dem geringen Fluoreszenzsignal der mit GFP fusionierten Kinase liegen, das sich auch durch eine Überexpression mit Hilfe

des starken *tef-1*-Promotors nur unzureichend verbessern ließ. Im Gegensatz hierzu konnte die Fluoreszenzintensität der MAPKK MEK-2 durch eine Überexpression mit Hilfe des *tef-1*-Promotors stark verbessert werden, obwohl beide Kinasen bei einer Expression durch die jeweiligen nativen Promotoren ähnlich starke Fluoreszenzsignale aufweisen. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf eine unterschiedliche Regulation der Genexpression dieser beiden Kinasen sein. Die intensiven Fluoreszenzsignale von überexprimiertem MEK-2-GFP deuten dabei darauf hin, dass die Expression der Kinase zu einem großen Teil auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Die geringen Fluoreszenzintensitäten von überexprimiertem NRC-1-GFP könnten im Gegensatz dazu ein Hinweis darauf sein, dass die Expression der Kinase zusätzlich durch post-transkriptionelle Mechanismen auf Ebene der RNA oder durch translationale Mechanismen beispielsweise bei der Initiation der Translation reguliert werden könnte. Die geringen Fluoreszenzsignale von NRC-1 wurden (auch nach einer Überexpression der Kinase) in anderen Arbeiten bestätigt [Jonkers et al., 2014]. In der Hefe *S. cerevisiae* wurde dagegen von keinem mangelhaften Fluoreszenzsignal von Ste11-Fusionsproteinen berichtet. Dennoch lokalisiert die Kinase auch in der Hefe nur zu einem geringen Teil an der Spitze der *Shmoos* [Maeder et al., 2007]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch die Kinase NRC-1 in *N. crassa* nur teilweise an den Spitzen lokalisieren könnte. Diese Möglichkeit wird durch Lokalisationsexperimente in reifen Hyphen unterstützt, in denen NRC-1-GFP trotz des relativ geringen Fluoreszenzsignals im Vergleich zu MEK-2 oder MAK-2 sehr deutlich an den Septen lokalisiert.

4.1.3. Unterschiedliche physiologische Konzentrationen der Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls tragen möglicherweise zur Sensitivität der Signaltransduktion bei

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen in dieser Arbeit, in denen *nrc-1-gfp*, *mek-2-gfp* und *mak-2-gfp* mit Hilfe der jeweiligen nativen Promotoren exprimiert wurden, zeigen, dass die Kinasen in sehr unterschiedlichen Mengen in den Zellen vorhanden sind. Während NRC-1-GFP und MEK-2-GFP unter nativen Expressionsbedingungen (allerdings am *his-3*-Lokus) in Keimlingen nicht detektierbar und in reifen Hyphen nur an den Septen zu sehen

sind, wird MAK-2 unter diesen Expressionsbedingungen in Keimlingen und reifen Hyphen cytoplasmatisch, im Zellkern und an den Septen detektiert. In interagierenden Keimlingen oszilliert MAK-2 an den Spitzen der Interaktionspartner. Die beobachteten unterschiedlichen Mengen der Kinasen, mit einer steigenden Konzentration von den *Upstream*-Kinasen NRC-1 und MEK-2 zu der MAPK MAK-2, wurden bereits zuvor in verschiedenen MAP-Kinasen-Kaskaden aus Pilzen und Tieren beobachtet [Ferrell, 1996]. Beispielsweise in der Hefe *S. cerevisiae* gehen Quantifizierungen der Anzahl an Molekülen der jeweiligen Kinasen der Fus3 MAP-Kinasen-Kaskade und des Gerüstproteins Ste5 zwar weit auseinander, aber alle Autoren gehen übereinstimmend davon aus, dass die Anzahl der Fus3-Moleküle je Zelle die Anzahl der Ste11- und Ste7-Moleküle bei weitem übertrifft [Ghaemmaghami et al., 2003; Slaughter et al., 2007; Maeder et al., 2007; Thomson et al., 2011]. Anhand von mathematischen Modellierungen der Signalweiterleitung wurde vorgeschlagen, dass eine sequentielle Signalamplifizierung durch MAP-Kinasen-Kaskaden eine besonders schnelle Antwort bei geringer externer Stimulation ermöglicht, in dem eine MAPKKK mehrere nachfolgende Kinasen aktiviert [Nakabayashi and Sasaki, 2005].

4.1.4. MEK-2 könnte teilweise unabhängig von HAM-5 an die Plasmamembran rekrutiert werden

Unabhängig von einer möglichen biologischen Bedeutung des Konzentrationsgefälles der drei Kinasen des untersuchten MAP-Kinasen-Moduls in *N. crassa* wurden in dieser Arbeit keine negativen Effekte durch eine Überexpression der Kinasen festgestellt. Es wurde jedoch beobachtet, dass die Oszillation der MAPKK MEK-2 in interagierenden Keimlingen im Vergleich zu der MAPK MAK-2 etwas weniger strikt getrennt verlief. So kam es vor, dass überexprimiertes MEK-2 stark an der Spitze eines Keimlings akkumulierte, während an der Spitze des Interaktionspartners ebenfalls ein geringes Fluoreszenzsignal zu beobachten war, das erst wenig später verschwand. Darüber hinaus wurden während der Co-Lokalisierungen mit MAK-2, in denen beide Kinasen überexprimiert wurden, mehrfach einzelne Punkte beobachtet, die MEK-2 aber kein MAK-2 enthielten. Obwohl in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, ob diese Komplexe eine physiologische Rolle spielen könnten, legen die fluoreszenzmikroskopischen Analysen die Vermutung nahe, dass es sich bei den MEK-2-Punkten zumindest in dieser Intensität um

Artefakte durch die Überexpression handeln könnte. Im Einklang mit den hier beschriebenen Beobachtungen zeigen experimentelle Daten und mathematische Modellierungen aus der Hefe *S. cerevisiae*, dass die Menge des Gerüstprotein Ste5 ein limitierender Faktor ist, der die maximale Signalweiterleitung bestimmt. Eine Überexpression von Ste7 führt bei physiologischer Ste5-Konzentration daher zu keiner schnelleren oder vermehrten Signalweiterleitung [Chapman and Asthagiri, 2009; Thomson et al., 2011]. Die Quantifizierung von Protein-Komplexen in ruhenden und Pheromon-behandelten Zellen führte aber zu der Vermutung, dass Ste7 teilweise unabhängig von Ste5 an die Plasmamembran rekrutiert werden könnte. Als möglicher Interaktionspartner wurde das Gerüstprotein Spa2 vorgeschlagen [Maeder et al., 2007]. Analog hierzu wäre es auch in *N. crassa* möglich, dass nur ein Teil der MAPKK MEK-2 durch das Gerüstprotein HAM-5 an die Plasmamembran interagierender Keimlinge rekrutiert wird. Ob darüber hinaus zusätzliche Rekrutierungsmechanismen existieren, und ob diese eine Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation übernehmen, könnte in der Zukunft Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sein (Abschnitt 4.2.8 und Abbildung 4.2).

4.1.5. Möglicherweise erfüllen die Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls weitere Aufgaben am zukünftigen Fusionspunkt

Nach einer erfolgreichen Zell-Zell-Kommunikation zeigen die Co-Lokalisierungs-Experimente, dass NRC-1 und MEK-2 mit der MAP-Kinase MAK-2 am Berührungspunkt co-lokalisieren. Neben den Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls lokalisieren weitere Faktoren an dem Berührungspunkt und teilweise um die sich öffnende Fusionspore. Darunter die MAP Kinase des *Cell Wall Integrity Pathways* in *N. crassa*, MAK-1, sowie die Polaritätskomponenten BUD-6, BNI-1 und SPA-2 [Fleissner et al., 2009; Weichert et al., 2016; Lichius et al., 2012b]. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Kinasen der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade auch nach der Phase der Zellinteraktion und des gerichteten Wachstums möglicherweise im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren Funktionen bei der eigentlichen Zellfusion und der Öffnung der Fusionspore haben könnten. Im Einklang mit dieser Hypothese wurde gezeigt, dass das Öffnen der Fusionspore sich verzögert, wenn die Aktivität der inhibierbaren Kinasevariante MAK-2^{Q100G} in einer späten Phase des gerichteten Wachstums durch die Zugabe des Inhibitors blockiert wird [Fleissner et al., 2009]. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität der MAP-Kinase MAK-1 essentiell

für eine erfolgreiche Zellfusion und die Öffnung der Fusionspore, wie mit Hilfe der inhibierbaren Kinasevariante MAK-1^{E104G} gezeigt wurde. Diese Beobachtung ist nicht überraschend, da nach der Herstellung eines physischen Kontakts zwischen den interagierenden Keimlingen ein Umbau der Zellwand notwendig ist, um die Zellmembranen in räumliche Nähe zueinander zu bringen und eine Fusion zu ermöglichen [Lichius, 2010]. Eine funktionelle Verbindung zwischen den Kinasen des MAK-1 MAP-Kinasen-Moduls und der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade wurde in der Literatur bereits mehrfach vorgeschlagen, wobei MAK-2 den Phosphorylierungsgrad von MAK-1 vermutlich indirekt beeinflusst [Lichius, 2010; Dettmann et al., 2013; Jonkers et al., 2014; Kamei et al., 2016]. Ob MAK-2 auch während des gerichteten Wachstums, des Zellwandumbaus und der Öffnung der Fusionspore zu einer effizienten Aktivierung von MAK-1 beiträgt, und ob weitere MAK-2-abhängige Mechanismen bei der Öffnung der Fusionspore beteiligt sind, ist eine interessante Frage, die zukünftig untersucht werden sollte.

4.1.6. Septen - eine Signalplattform

In reifen Hyphen haben Lokalisierungsexperimente gezeigt, dass alle drei Kinasen der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade um die Septenpore herum akkumulieren. Diese Lokalisation wurde auch für andere regulatorische Proteine in *N. crassa* und weiteren filamentösen Pilzen beobachtet. In den letzten Jahren hat sich daher ein Modell durchgesetzt, das die Septen als aktive Signalplattformen betrachtet, weshalb sie auch als *Signaling Hub* bezeichnet werden [Seiler and Justa-Schuch, 2010; Riquelme et al., 2011; Dettmann et al., 2012]. Unter einem *Hub* versteht man in der Netzwerktheorie, die auch für biologische Netzwerke Anwendung findet, einen hoch vernetzten Knotenpunkt. Beispielsweise in einem biologischen Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk stellt jeder Knoten (Punkt) ein Protein dar und jede Kante (Strich) zwischen zwei Knoten steht für eine Interaktion zwischen den entsprechenden Proteinen. Ein *Hub* ist also ein Knoten, der über viele Kanten mit weiteren Knoten verbunden ist [Barabási and Oltvai, 2004; Albert, 2005]. In biologischen (und nicht-biologischen) Netzwerken sorgen sie einerseits für Robustheit innerhalb des Netzwerks, indem sie durch ihre starke Vernetzung oftmals den Ausfall kleinerer Knotenpunkte überbrücken können. Andererseits machen sie das Netzwerk auch anfällig, denn falls ein *Hub* ausfällt können damit ganze Signalwege ausgeschaltet werden. Da die *Hubs* in einem Netzwerk zahlenmäßig sehr selten vorkommen, ist der

Ausfall eines Hubs statistisch gesehen unwahrscheinlicher. Ein Netzwerk, das eine Topologie mit wenigen stark verzweigten *Hubs* und vielen wenig vernetzten Knoten aufweist wird häufig als skalenfreies Netzwerk bezeichnet (Abbildung 4.1A). Das Vorhandensein von *Hubs* wird in biologischen Interaktionsnetzwerken häufig beobachtet und deswegen als biologisch sinnvoll erachtet [Jeong et al., 2000; Aldana and Cluzel, 2003; Albert, 2005]. Gleichmaßen könnte es auch biologisch sinnvoll sein, stark vernetzte Proteine innerhalb der Zelle (die in entsprechenden Interaktionsnetzwerken also die *Hubs* darstellen) räumlich auf wenige aber hoch spezialisierte Sub-Kompartimente zu beschränken - also auch auf räumlicher Ebene *Hubs* zu schaffen (Abbildung 4.1B). Diese würden vermutlich ebenfalls mit den Vor- und Nachteilen der *Hubs* in der Netzwerktheorie einhergehen, also einer hohen Robustheit gegen zufällige Ausfälle und einer großen Fehleranfälligkeit bei der funktionellen Einschränkung weniger hochspezialisierter Kompartimente. Als weiteres Beispiel für einen räumlichen *Hub* könnten die sogenannten *Lipid Rafts* dienen. Hierbei handelt es sich um spezielle Bereiche in Zellmembranen, die sich von der restlichen Membran durch eine veränderte Lipid- und Protein-Zusammensetzung unterscheiden und vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Signalweiterleitung und regulatorischen Prozessen einnehmen [Foster et al., 2003].

Obwohl in *N. crassa* bisher keine Funktion für die Kinasen der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade an den Septen bekannt ist, deutet diese Lokalisation auf spezifische regulatorische Aufgaben hin. Eine erste Vermutung, dass die Kinasen der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade bei der Bildung der Septen beteiligt sein könnten, wurde in Co-Lokalisierungs-Experimenten mit dem Chitinsynthase Regulator 3 (CSR-3), der bei diesem Prozesse eine Rolle spielen soll, nicht bestätigt. Während CSR-3 nur an den sich bildenden Septen lokalisiert, akkumulieren die Kinasen MEK-2 und MAK-2 erst zu einem späteren Zeitpunkt an den Septen, wenn diese sich bereits vollständig gebildet haben [Herzog, persönliche Mitteilung]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Phänotypen der *nrc-1*-, *mek-2*- und *mak-2*-Deletionsmutanten, die keine Hinweise auf Defekte bei der Septierung liefern [Lichius et al., 2012a].

Untersuchungen mit der inhibierbaren Kinasevariante MAK-2^{Q100A}-GFP deuten jedoch darauf hin, dass MAK-2 an den Septen eine Funktion bei der Regulation des Porenverschlusses übernehmen könnte. Wird die Aktivität der Kinase in reifen Hyphen durch Zugabe eines ATP-Analogs inhibiert, werden die Poren der Septen geschlossen, so dass kein Cytoplasma und

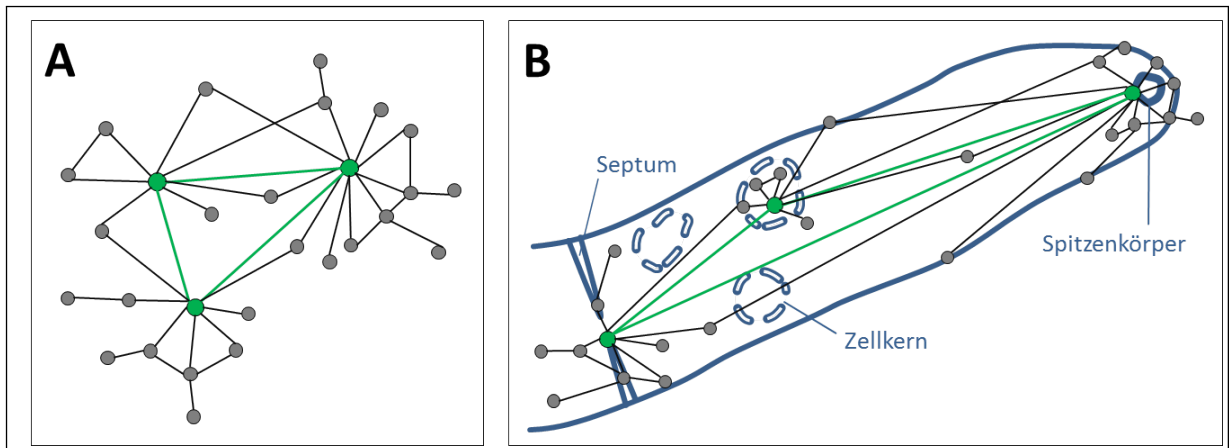


Abbildung 4.1.: Netzwerktopologie im räumlichen Kontext

A) Exemplarisches Beispiel eines skalensches Netzwerks in Anlehnung an [Barabási and Oltvai, 2004]. B) Beispielhafte Anordnung des exemplarischen skalensches Netzwerks aus (A) im räumlichen Kontext einer wachsenden Hyphe in *N. crassa* (nicht maßstabsgetreu). In diesem Modell bilden die stark vernetzten *Hubs* (in grün dargestellt) auch räumliche *Cluster*.

keine Organellen mehr hindurch gelangen. Gleichzeitig verändert sich die subzelluläre Lokalisation der Kinase. Während sie vorher spezifisch um die Septenpore herum akkumuliert, ist sie nach der Inhibierung auf beiden Seiten über das gesamte Septum zu sehen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivität der Kinase notwendig ist, um die Poren offen zu halten [Serrano, persönliche Mitteilung]. Unter natürlichen Bedingungen findet ein Porenverschluss nach der Verletzung einer Hyphe in angrenzenden Kompartimenten, oder im Inneren der Kolonie in intakten Hyphen statt. Dabei wurden in filamentösen Ascomyceten zwei unabhängige Mechanismen zum Verschließen der Poren beschrieben. Der erste Mechanismus führt zu einem Verschluss der Pore durch die Einlagerung von unbekanntem Material. Da dieser Porenverschluss in den inneren Bereichen der Kolonie beobachtet wird, in dem sich die älteren Hyphenkompartimente befinden, wurde dieser Prozess mit dem Altern in Verbindung gebracht. Der zweite Mechanismus wird sowohl im Inneren der Kolonien als auch nach einer Verletzung der Hyphen beobachtet. Dabei lagert sich ein spezialisiertes Organell, der *Woronin Body*, in der Pore an und verschließt die Öffnung mechanisch [Markham and Collinge, 1987; Markham, 1994]. In intakten Hyphen von *Aspergillus oryzae* wurde in *Live Cell Imaging*-Experimenten beobachtet, dass der *Woronin Body*-abhängige Verschluss von Septenporen reversibel ist. Eine genaue Funktion für den Verschluss der Poren ist bisher nicht bekannt, es wird aber vermutet, dass hierdurch heterogene Bereiche innerhalb einer Kolonie geschaffen werden, die sich unter anderem durch ihre Genexpression unterscheiden. Hierdurch könnte

die allgemeine Fitness der Kolonie in der natürlichen Umgebung verbessert werden, indem einzelne Hyphenbereiche schnell auf verschiedene Stressfaktoren reagieren können [Bleichrodt et al., 2012]. In *N. crassa* ist interessanterweise das Protein SO, der Gegenspieler von MAK-2 während der Keimlings- und vegetativen Hyphenfusion, beim Porenverschluss nach einer Verletzung der Hyphe beteiligt und lokalisiert auch im Inneren der Kolonie an Poren, die unabhängig vom *Woronin Body* verschlossen wurden. Diese Lokalisation und Funktion wurde in *A. oryzae* bestätigt und um die Beobachtung ergänzt, dass das zu SO homologe Protein AoSO unter verschiedenen Stressbedingungen teilweise reversibel an den Septenporen lokalisiert [Maruyama et al., 2010]. Unabhängig davon wurde in Keimlingen von *N. crassa* mit Hilfe des für eine inhibierbare Kinasevariante kodierenden *mak-2^{Q100A}*-Allels gezeigt, dass die Unterbrechung der MAK-2-Aktivität zu einer Akkumulation von SO an der Plasmamembran beider Fusionspartnern führt [Fleissner and Glass, 2007; Fleissner et al., 2009]. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei dem Porenverschluss von verletzten oder alternden Hyphen eine Rolle spielen. Dabei könnte durch eine Verletzung, während der Alterung von Hyphen, oder durch unterschiedliche Stressfaktoren die Aktivität von MAK-2 variieren, wodurch die Akkumulation von SO an nahegelegenen Septenporen reguliert und ein Verschluss der Porenöffnung in *Woronin Body*-abhängigen oder -unabhängigen Mechanismen gefördert werden könnte. Um diese Hypothese zu testen, wäre es daher sehr interessant während der Mikroskopie an den durch die Inhibition der MAK-2^{Q100A}-GFP-Aktivität geschlossenen Poren SO zu lokalisieren und darauf zu achten, ob dieses an der geschlossenen Septenpore akkumuliert und ob es zu einer Anlagerung von *Woronin Bodies* kommt.

4.2. Misslokalisierung von Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade

Die in interagierenden Keimlingen exakt aufeinander abgestimmte subzelluläre Lokalisation von SO und MAK-2 deutet auf einen hochregulierten Prozess hin. Dabei ist die dynamische Oszillation der beiden Proteine sowohl innerhalb einer Zelle, als auch über eine räumliche Distanz hinweg mit der Partnerzelle genau koordiniert. Versuche mit einer inhibierbaren MAK-2^{Q100G}-Kinase zeigen, dass die Aktivität von MAK-2 die Lokalisation von SO sowohl intra- als auch

interzellulär beeinflusst [Fleissner et al., 2009]. Diese Daten zeigen einen engen Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Lokalisation der Proteine. Die Aktivität einer Kinase bestimmt darüber hinaus maßgeblich auch ihre Funktion, indem nur die aktivierte Form der Kinase Zielproteine phosphoryliert. Weniger ist im Gegensatz dazu über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Funktion von Proteinen bekannt. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurde MAK-2 in *N. crassa* über einen GFP-CAAX-Anker artifizell und permanent an die Plasmamembran dirigiert. Durch diese Misslokalisierung sollte die subzelluläre Dynamik der Kinase komplett unterbrochen und die Funktion anhand der permanent membrangebundenen Kinasevariante untersucht werden. Das Plasmid, auf dem die *gfp-caax*-Sequenz kodiert ist, wurde dabei bewusst modular aufgebaut, um einen Austausch einzelner Komponenten zu vereinfachen. Durch mehrere *Multiple Cloning Sites* in dem Plasmid ist ein Austausch der Promotorsequenz, des Zielgens und/oder der *gfp-caax*-Sequenz leicht möglich [Lemanski, 2010]. In dieser Arbeit wurde dieses Ausgangsplasmid daher verwendet, um verschiedene Promotoren zu testen, die Genprodukte von *mak-2* und *mek-2* an die Plasmamembran zu dirigieren und eine *gfp-saax*-Sequenz als Kontrolle einzuführen, deren Genprodukt dem CAAX-Anker bis auf eine Aminosäure entspricht, im Gegensatz dazu aber keine Membranverankerung vermittelt. Die Fusionskonstrukte *mak-2-gfp-caax* bzw. *mek-2-gfp-caax* kodieren dabei für die membrangebundenen Kinasevarianten MAK-2-GFP-CAAX bzw. MEK-2-GFP-CAAX, die im Gegensatz zu den nativen Kinasen keine subzelluläre Dynamik aufweisen.

4.2.1. Die subzelluläre Dynamik von MAK-2 ist essentiell für die Funktionen der Kinase

Die Expression von *mak-2-gfp-caax* im $\Delta mak-2$ -Hintergrund komplementiert die Defekte der Deletionsmutante nicht. Die entsprechenden Stämme MT-22-640 (*ptef-1-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) und MT-21-643 (*pmak-2-mak-2-gfp-caax*, $\Delta mak-2$) lassen sich phänotypisch nicht von der $\Delta mak-2$ -Mutante unterscheiden. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine freie Beweglichkeit von MAK-2 essentiell für die Funktion der Kinase ist. In der Hefe *S. cerevisiae* akkumuliert die homologe Kinase Fus3 nach einer Behandlung mit Pheromonen des entgegengesetzten

Phänotyps stärker im Zellkern, wo sie den Transkriptionsfaktor Ste12 phosphoryliert [van Drogen et al., 2001; Maeder et al., 2007]. Ste12 reguliert die Expression von Genen, die für die Pheromon-Antwort von Bedeutung sind [Roberts et al., 2000; Bardwell, 2005]. In *N. crassa* lokalisiert MAK-2 in interagierenden und isolierten Keimlingen im Cytoplasma und in den Zellkernen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der zu Ste12 homologe Transkriptionsfaktor PP-1 aus *N. crassa* die Expression von Genen reguliert, die für die Zell-Zell-Kommunikation und -Fusion eine Rolle spielen [Li et al., 2005; Leeder et al., 2013]. Gemeinsam deuten diese Daten darauf hin, dass auch in *N. crassa* aktiviertes MAK-2 in den Zellkern wandern und dort den Transkriptionsfaktor PP-1 phosphorylieren könnte, und dass dieser Schritt essentiell für die Funktion der MAP-Kinase und die vegetative Zell-Zell-Kommunikation ist. Diese Vermutung wird auch durch Versuche unterstützt, in denen die Protein-Synthese während der Keimlingsfusion in *N. crassa* durch die Zugabe von Cycloheximid blockiert wurde. Diese Experimente deuten darauf hin, dass die Initiierung der Zell-Kommunikation von einer *de novo*-Proteinsynthese abhängt [Fleissner et al., 2009]. Darüber hinaus ist es möglich, dass MAK-2 neben PP-1 noch weitere Substrate im Zellkern und Cytoplasma phosphoryliert, die für die Initiierung oder Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kommunikation von Bedeutung sind. Neue Daten aus der Hefe *S. cerevisiae* betonen die Relevanz der Kern-Lokalisation der homologen MAP-Kinase Fus3 für das *Mating*. Eine mit dem Histon H2B fusionierte Kinasevariante Fus3-GFP-Htb2 lokalisiert permanent im Zellkern. In Abwesenheit der nativen Kinase und der deaktivierenden Phosphatasen Msg5, Ptp2 und Ptp3 ist die Mating-Effizienz dieser Stämme im Vergleich zum Wildtyp überraschenderweise um weniger als die Hälfte reduziert. In Zellen mit dem selben Deletionshintergrund, welche die permanent an die Plasmamembran gebundene Kinasevariante Fus3-GFP-CCaaX enthalten, ist das *Mating* im Vergleich zum Wildtyp dagegen um etwa 90 % reduziert. Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass eine freie Beweglichkeit für die volle Funktion der Kinase notwendig ist. Auf der anderen Seite zeigen sie auch, dass die Kinase Fus3 im Zellkern wichtige Aufgaben übernimmt [Chen et al., 2010].

4.2.2. Die subzelluläre Dynamik von MEK-2 ist nicht essentiell für vegetative Zellfusionen

Im Gegensatz zu MAK-2 ist die *Upstream*-Kinase MEK-2 in *N. crassa* aus dem Zellkern ausgeschlossen und übernimmt daher vermutlich keine regulatorischen Funktionen im Zellkern. Gleichzeitig co-lokalisiert MEK-2 in interagierenden Keimlingen mit der MAP-Kinase MAK-2. Damit ist MEK-2 ein interessanter Kandidat, um die Funktion der Dynamik des MAP-Kinasen-Moduls genauer zu untersuchen. Tatsächlich führt die Expression von *mek-2-gfp-caax* im Δ *mek-2*-Hintergrund zu einer partiellen Komplementation einiger Defekte der *mek-2*-Deletionsmutante. Auf mikroskopischer Ebene weisen die erhaltenen Stämme zwei interessante Phänotypen auf. Zum Einen sind die Keimlingsinteraktionen je nach verwendetem Promotor stark reduziert (nativer Promotor) oder gar nicht vorhanden (*tef-1*-Promotor), während jeweils normal aussehende Hyphenfusionen stattfinden. Eine Quantifizierung von Hyphenfusionen ist in *N. crassa* auf Grund der Beschränkung der Fusionen auf bestimmte Bereiche innerhalb des Myzels, der allgemein unregelmäßigen Verteilung und dem teilweise dichten Wachstum der Hyphen schwierig durchzuführen und möglicherweise unzuverlässig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auf eine Quantifizierung verzichtet, sodass an dieser Stelle keine Aussage über die Häufigkeit des Auftretens von Hyphenfusionen in den *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen im Vergleich zum Wildtyp getroffen werden können. Im allgemeinen war es aber während der Mikroskopie weder im Wildtyp noch in den untersuchten Mutanten schwierig fusionierte Hyphen zu finden. Der zweite interessante Phänotyp ist ein starker Polaritätsdefekt in Keimlingen, die *mek-2-gfp-caax* überexprimieren. Auch dieser Defekt ist in reifen Hyphen nicht mehr vorhanden. Die Begrenzung dieser beiden Defekte auf eine frühe Entwicklungsphase von *N. crassa* könnte darauf hindeuten, dass es sich bei dem Fusionsdefekt um einen indirekten Effekt durch den Polaritätsdefekt der Keimlinge handelt (Abschnitt 4.2.8 und 4.2.9). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die subzelluläre Dynamik von MEK-2 nicht essentiell für vegetative Zellfusionen ist. Dennoch scheint die Dynamik von MEK-2 zur Funktion der Kinase beizutragen, da die Defekte der *mek-2*-Deletionsmutante durch die Expression von *mek-2-gfp-caax* nur partiell komplementiert werden (Abschnitt 4.2.4).

4.2.3. Artifizuell membrangebundenes MAK-2 liegt hyperphosphoryliert vor

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die membrangebundene Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX die Funktion der nativen Kinase nicht erfüllen kann. Die Funktion von MAP-Kinasen ist eng mit ihrer Aktivierung verbunden. Damit sie ihre Zielsubstrate phosphorylieren, also ihre Funktion ausführen können, müssen die Kinasen zuerst durch *Upstream*-Komponenten durch eine Phosphorylierung aktiviert werden [Garrington and Johnson, 1999]. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die Misslokalisierung von MAK-2-GFP-CAAX eine Aktivierung durch die *Upstream*-Kinase MEK-2 verhindert, was den Funktionsverlust der Kinase erklären würde. Überraschenderweise wurde dabei herausgefunden, dass die membrangebundene und nicht-funktionale Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX hyperphosphoryliert vorliegt. Trotz der Aktivierung der Kinase kann sie ihre Funktion nicht ausführen. Wie zuvor beschrieben könnte dies an der eingeschränkten Beweglichkeit der Kinase liegen und an der fehlenden Möglichkeit Substrate in anderen Kompartimenten als der Membran zu phosphorylieren (Abschnitt 4.2.1). Dieses Ergebnis hebt den vermuteten engen Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Funktion der Kinase hervor. In Stämmen, die *mak-2-gfp-caax* im Deletionshintergrund der *Upstream*-Kinasen exprimieren, werden die Defekte der Ausgangsstämme ($\Delta mek-2$ und $\Delta nrc-1$) ebenfalls nicht komplementiert. Wie erwartet wurde die membrangebundene Kinasenvariante MAK-2-GFP-CAAX in Abwesenheit von MEK-2 oder NRC-1 nicht phosphoryliert. Durch dieses Ergebnis wird bestätigt, dass die Phosphorylierung von MAK-2-GFP-CAAX wie vermutet durch die MAP-Kinasen-Kaskade übertragen wird und Artefakte wie eine Autophosphorylierung der membrangebundenen MAK-2 Kinasevariante ausgeschlossen.

Die Hyperphosphorylierung der membrangebundenen MAK-2-GFP-CAAX-Kinasevariante zeigt, dass die Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade an der Plasmamembran stattfinden kann und deutet darauf hin, dass sie sogar hauptsächlich an der Plasmamembran stattfindet. Die Proteinextrakte, in denen der Phosphorylierungszustand von MAK-2 und MAK-2-GFP-CAAX bestimmt wurde, wurden aus Kulturen gewonnen, die in flüssigem Minimalmedium unter Schütteln angezogen wurden. Durch die ständige Bewegung werden keine stabilen Zell-Zell-Interaktionen und somit nur eine basale Aktivierung von MAK-2 erwartet. Die Hyperaktivierung von MAK-2-GFP-CAAX deutet daher darauf hin, dass die Membranrekrutierung von MAK-2 *per*

se, also auch in Abwesenheit oder bei sehr geringen Konzentrationen des unbekannten Chemotaktanten, zu einer Phosphorylierung der Kinase führt. Es ist allerdings noch ungeklärt, ob die beobachtete Hyperphosphorylierung tatsächlich nur aus einer erhöhten Phosphorylierung an der Plasmamembran resultiert. Eine weitere Erklärung könnte auch eine reduzierte Dephosphorylierung der membrangebundenen Kinasevariante sein, wenn diese Lokalisation vor dem Zugang von Phosphatasen schützt. Tatsächlich deuten Daten aus der Hefe darauf hin, dass eine Dephosphorylierung von aktiviertem Fus3 im Cytoplasma und im Zellkern stattfindet [Maeder et al., 2007; Chen et al., 2010]. Die dephosphorylierenden Faktoren in der Hefe sind die Phosphatasen Msg5, Ptp2 und Ptp3, die im Zellkern und/oder im Cytoplasma lokalisieren [Blackwell et al., 2007; Mattison et al., 1999]. Die homologen Phosphatasen in *N. crassa* sind MSG-5 und PTP-2/3. Experimente, in denen diese ebenfalls über einen CAAX-Anker an die Plasmamembran dirigiert und mit der membrangebundenen MAK-2 Kinasevariante in einem Keimling exprimiert werden sollten scheiterten daran, dass weder die mit GFP noch mit GFP-CAAX fusionierten Phosphatasen in Keimlingen oder Hyphen lokalisiert werden konnten (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.2.4. Die künstliche Membranrekrutierung von MEK-2-GFP-CAAX könnte eine zeitliche Regulierung der MAK-2-Aktivität stören

Die Defekte der $\Delta mek-2$ - und $\Delta nrc-1$ -Mutante stimmen weitestgehend mit den Defekten der $\Delta mak-2$ -Mutante überein, und es wird angenommen, dass diese Defekte auch zu einem erheblichen Teil auf die fehlende Aktivität und damit Funktion von MAK-2 zurückzuführen sind [Maerz et al., 2008]. In dieser Arbeit war es daher besonders interessant, den Phosphorylierungsstatus von nativem MAK-2 in *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen zu untersuchen. Die Defekte der *mek-2*-Deletionsmutante werden durch die Expression von *mek-2-gfp-caax* teilweise komplementiert. Es wurde daher angenommen, dass MAK-2 in diesen Stämmen teilweise funktional ist, was eine Phosphorylierung der Kinase voraussetzt. Die erwartete Phosphorylierung von MAK-2 durch die membrangebundene MAPKK MEK-2-GFP-CAAX wurde in dieser Arbeit (in Abwesenheit von nativem MEK-2) bestätigt, was wiederum die Frage aufwirft, weshalb die Defekte der Deletionsmutante nur partiell komplementiert werden. Trotz der Aktivierung und der freien Beweglichkeit von MAK-2 in den entsprechenden Stämmen scheint

die Kinase ihre Funktion nur teilweise ausüben zu können. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine zu starke oder zu schwache Aktivierung der Kinase sein. Während der Entstehung dieser Arbeit wurde bereits in anderen Arbeiten diskutiert, ob MAK-2 in *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen stärker phosphoryliert wird als im Wildtyp. Durch die starke Variabilität des Phosphorylierungszustandes von MAK-2 sowohl im Wildtyp als auch in den *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämmen wurde diese Frage aber weder in dieser noch in anderen Arbeiten zufriedenstellend beantwortet (Abschnitt 4.2.4 und [Letz, 2014; Thieme, 2014]).

Eine ergänzende Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus der beobachteten Dynamik von MAK-2. Diese deutet darauf hin, dass nicht nur die räumliche, sondern auch die zeitliche Komponente während der Keimlingsinteraktion eine bedeutende Rolle spielen könnte. Die hoch koordinierte subzelluläre Dynamik von MAK-2 und dem Gegenspieler SO während der Keimlingsinteraktion deuten darauf hin, dass zeitlich stark regulierte Zyklen von Aktivierung und Deaktivierung von MAK-2 eine Rolle für die Funktion der Kinase spielen könnten. Die Hyperphosphorylierung der membrangebundenen Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX deutet darauf hin, dass eine Aktivierung des MAP-Kinasen-Moduls allein durch eine Rekrutierung der Komponenten an die Plasmamembran stattfindet. Konsequenterweise könnte auch durch die permanente Membranlokalisation von MAK-2-GFP-CAAX die MAP-Kinase MAK-2 permanent an der Plasmamembran aktiviert werden. Hierdurch könnte der zeitliche Ablauf eines zyklisch oszillierenden MAK-2-Aktivierungsstatus, der im Wildtyp mit der subzellulären Dynamik der Kinase korrelieren könnte, gestört werden. Im Einklang zu dieser Hypothese wurde auch in der Hefe *S. cerevisiae* gezeigt, dass der Aktivierungsstatus der homologen MAP-Kinase Fus3 während einer dauerhaften Pheromonbehandlung oszilliert. Dabei erreicht der Phosphorylierungsgrad der Kinase etwa alle 1 bis 2 Stunden ein Maximum. Interessanterweise korrelieren die Phasen, in denen der Aktivierungsstatus von Fus3 steigt mit der Bildung von *Shmoos* [Hilioti et al., 2008]. Im Einklang mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit könnte in *N. crassa* ein oszillierender Aktivierungsstatus von MAK-2 mit der subzellulären Dynamik der Kinase zusammenhängen (Aktivierung an der Plasmamembran, Deaktivierung im Cytoplasma und Zellern). Eine mögliche Oszillation des Aktivierungsstatus von MAK-2 würde dann im Vergleich zur Hefe in wesentlich kürzeren Zeitabständen (ca. 6 bis 12 Minuten) stattfinden und könnte in Verbindung mit dem gerichteten Wachstum der Keimschläuche stehen (Abschnitt 4.2.8 und Abbildung 4.2). Darüber hinaus

wäre es aber auch möglich, dass die Expression von *mek-2-gfp-caax* nur zu einer partiellen Komplementation der Defekte der Deletionsmutante führt, wenn die permanente Membranlokalisation von MEK-2 andere beteiligte Proteine stört oder Interaktionen mit weiteren Faktoren zeitlich unkontrolliert stattfinden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Membranrestriktion von MEK-2 Funktionen oder Protein-Interaktionen im Cytoplasma verhindert, sodass die membrangebundene Kinasevariante nicht alle Aufgaben ausüben kann.

4.2.5. Destabilisierung von MAK-2 und MEK-2 an der Plasmamembran könnte als negativer Regulationsmechanismus wirken

Mikroskopische Untersuchungen der *mak-2-gfp(-s/caax)* und *mek-2-gfp(-s/caax)*-exprimierenden Stämmen zeigten übereinstimmend, dass die Visualisierbarkeit der GFP(-SAAX)-Fusionsproteine einfacher war als die der GFP-CAAX-Fusionsproteine. In den CAAX-Stämmen war das Fluoreszenzsignal häufig schwach und akkumulierte besonders in Keimlingen stark in den Vakuolen. Dies führte zu der Vermutung, dass die Membranlokalisation in einer Destabilisierung und einem schnelleren Abbau der Proteine resultiert. Diese Vermutung wurde in Western-Blots bestätigt, in denen die GFP(-SAAX)-Fusionsproteine übereinstimmend intensivere Banden aufwiesen als die GFP-CAAX-Fusionsproteine. Diese Beobachtung wurde in sämtlichen in dieser Arbeit verwendeten Stämme übereinstimmend gemacht, unabhängig von dem verwendeten Promotor (*pccg-1*, *ptef-1*, *pmak-2*), dem Hintergrund des Empfängerstamms (Wildtyp, $\Delta mak-2$, $\Delta mek-2$) oder dem entsprechendem Gen (*mak-2*, *mek-2*). Vergleichbare Beobachtungen wurden auch in Experimenten mit der Hefe *S. cerevisiae* gemacht, in denen die zu MAK-2 homologe Kinase Fus3 über einen CAAX-Anker an die Plasmamembran dirigiert wurde [Chen et al., 2010]. Die Protein- und Spezies-übergreifende Verbreitung dieser Beobachtung deutet daher auf einen allgemeinen Mechanismus hin.

Mathematische Modellierungen des „Zelldialogs“ in *N. crassa* deuten darauf hin, dass genetisch identische Zellen durch diesen Mechanismus interagieren können, ohne sich selbst zu stimulieren. Voraussetzung hierfür sind positive und negative Rückkopplungsmechanismen [Goryachev et al., 2012]. Entsprechende Mechanismen wurden auch im *Yeast Mating Pheromone*

Pathway der Hefe *S. cerevisiae* gefunden und sind allgemeiner Bestandteil von Signaltransduktionswegen [Youk and Lim, 2014]. Ein möglicher positiver Rückkopplungsmechanismus während der Zell-Zell-Kommunikation in *N. crassa* ist die Regulation der Expression des *mak-2*-Gens durch den Transkriptionsfaktor *PP-1*, der seinerseits vermutlich durch aktiviertes MAK-2 aktiviert wird [Leeder et al., 2013]. Im Einklang mit der beobachteten Destabilisierung der membrangebundenen Kinasevarianten MAK-2-GFP-CAAX und MEK-2-GFP-CAAX könnte die Degradation dieser Proteine einen negativen Rückkopplungsmechanismus darstellen. Den Auslöser für die Degradation und damit verbundene Reduzierung der Signalweiterleitung könnte dabei grundsätzlich entweder die Membranlokalisierung oder die Aktivität der Kinasen darstellen.

Mehrere Beobachtungen in *N. crassa* deuten darauf hin, dass die Destabilisierung der membrangebundenen Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX mit der Membranrekrutierung und nicht mit der Hyperphosphorylierung zusammenhängt. Zum Einen sind die MAK-2-GFP-CAAX-Banden in Western-Blots unabhängig von dem Phosphorylierungsstatus der Kinase sehr schwach. Die membranlokalisierte Kinasenvariante ist auch in Abwesenheit der aktivierenden Kinasen MEK-2 oder NRC-1 nur in einer geringen Konzentration vorhanden und liegt unter diesen Bedingungen nicht phosphoryliert vor (Abschnitt 3.3.5). Zum Anderen zeigen Experimente mit einer nicht aktivierbaren, membrangebundenen MAK-2(T180A)(Y182F)-GFP-CAAX-Variante ebenfalls die im Vergleich zu den Kontroll-Kinasen typischen schwachen Banden in einem Western-Blot [Serrano, persönliche Mitteilung]. Insgesamt deuten diese Daten daher stark darauf hin, dass die Membranlokalisierung von MAK-2-GFP-CAAX und vermutlich auch MEK-2-GFP-CAAX unabhängig von dem jeweiligen Aktivierungsstatus zu einem schnellen Abbau der Kinasen führt. Daten aus der Hefe *S. cerevisiae* zeigen, dass ein durch Pheromone induzierter Abbau von Ste7 und Ste11 zur Spezifität der Signalkaskade und zur Verringerung der Aktivität von Fus3 beiträgt [Wang and Dohlman, 2002; Esch and Errede, 2002; Hurst and Dohlman, 2013]. Analog hierzu könnte in *N. crassa* die Membranlokalisierung die Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls für eine Degradation markieren und hierdurch einen Mechanismus zur Deaktivierung von MAK-2 und der Reduzierung der Signalweiterleitung darstellen.

Die hier und in anderen Studien vorgeschlagenen positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen auf Ebene der Genexpression oder Proteindegradation funktio-

nieren in der Regel zeitversetzt. Es ist daher beispielsweise für eine erfolgreiche Zellfusion durchaus sinnvoll, die Expression von Genen, deren Produkte erst zu späteren Zeitpunkten in der Zellfusion benötigt werden, frühzeitig durch positive Rückkopplungsmechanismen anzukurbeln oder die Sensibilisierung der Signaltransduktion gezielt über Proteindegradationsmechanismen zeitlich zu begrenzen. Auf Grund ihrer relativ langsamen Funktionsweise wurde aber vorgeschlagen, dass sie keine Rolle bei der oszillatorischen Rekrutierung von SO und MAK-2 an die Plasmamembran interagierender Keimlinge und Hyphen und, damit zusammenhängend, dem Wechsel der physiologischen Zustände vom Senden und Empfangen eines chemotropen Signals spielen [Goryachev et al., 2012]. Im Einklang mit dieser Vermutung wurde in *N. crassa* gezeigt, dass eine *de-novo*-Proteinbiosynthese essentiell für die Etablierung, aber nicht für die Weiterführung eines bereits robust stattfindenden „Zelldialogs“ ist [Fleissner et al., 2009]. Ob ein Abbau von membrangebundenen Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade dennoch zu der Entfernung der Kinasen von der Plasmamembran während des *Switching* beitragen könnte ist eine interessante Frage, die in der Zukunft weiter untersucht werden könnte.

4.2.6. Verschiedene Promotoren bieten unterschiedliche Vor- und Nachteile für eine Expression in *N. crassa*

Auf Grund der geringen Fluoreszenzintensitäten von MAK-2-GFP-CAAX und MEK-2-GFP-CAAX-Fusionsproteinen wurden in dieser Arbeit verschiedenen Promotoren ausprobiert, um die Genexpression der entsprechenden Fusionskonstrukte besonders in Keimlingen zu verbessern. Neben den jeweiligen nativen Promotoren wurden daher auch die Promotoren *ccg-1*, *gpd-1* und *tef-1* für die Expression von *mak-2-gfp(-c/saax)-* und *mek-2-gfp(-c/saax)-* Fusionskonstrukten verwendet.

Der *ccg-1*-Promotor wird in *N. crassa* häufig für Lokalisierungsexperimente benutzt [Freitag et al., 2004]. Das Gen *ccg-1* wurde unabhängig voneinander 1988 als *glucose-repressible gene 1 (grg-1)* und *clock-controlled gene 1 (ccg-1)* entdeckt [McNally and Free, 1988; Loros et al., 1989]. Die genaue Regulation des Gens ist komplex und nicht ausreichend untersucht. Wie der Name schon andeutet, wird die Expression durch die Anwesenheit von Glukose reprimiert.

Darüber hinaus ist bekannt, dass der Promotor in keimenden Sporen reprimiert ist und während der Sporulation in wachsenden Kolonien aktiviert wird [McNally and Free, 1988; Freitag et al., 2004]. Dieses Expressionsmuster ist für die Untersuchung instabiler Proteine während der Keimlingsfusionen nicht ideal. Zum Einen enthält das verwendete Medium Saccharose (Disaccharid aus einem Monomer Fruktose und einem Monomer Glukose), die während des Wachstums von *N. crassa* in seine Bestandteile zerlegt wird [Vogel, 1956; Beadle and Tatum, 1941]. Zum Anderen kann in Keimlingen ein schneller Protein-Abbau bei gleichzeitig geringer Synthese zu einer Akkumulation des Fluoreszenzsignals in den Vakuolen führen. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Lokalisierung von MAK-2-GFP und MEK-2-GFP in Keimlingen gut möglich ist, wenn die entsprechenden Fusionsgene mit Hilfe des *ccg-1*-Promotors exprimiert wurden. Im Gegensatz dazu ist eine Lokalisierung der instabilen CAAX-Fusionsproteine in Keimlingen oft schwierig, da das Fluoreszenzsignal stark in den Vakuolen akkumuliert (siehe Abschnitt 3.3.1).

Über den Promotor des *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1*-Gens (*gpd-1*) wurde zuvor berichtet, dass er in *N. crassa* konstitutiv exprimiert wird und erfolgreich für Überexpressions-Experimente eingesetzt wurde [Wang and Keasling, 2002]. In der hier vorliegenden Arbeit führte die Expression von *mak-2-gfp-caax* mit Hilfe des *gpd-1*-Promotors jedoch weder in Hyphen noch in Keimlingen zu zufriedenstellenden Fluoreszenzsignalen, so dass der Promotor nach den ersten Tests keine weitere Anwendung mehr fand.

Die Expression von *mak-2-gfp-caax* mit Hilfe des *tef-1*-Promotors führte dagegen zu guten Fluoreszenzsignalen besonders in Keimlingen. Das *tef-1*-Gen wurde als *translational elongation factor 1* (*tef-1*) identifiziert und spielt eine Rolle bei der Elongation während der Translation. Es ist daher zu erwarten, dass der Promotor konstitutiv aktiv ist und lediglich in Sporen, in denen der Stoffwechsel und somit auch die Translation reduziert ist, zu einem geringeren Fluoreszenzresultat führt [Ichi-ishi and Inoue, 1995; Berepiki et al., 2010]. Entsprechend fand die Selektion von fluoreszierenden Transformanten in dieser Arbeit teilweise in reifen Hyphen und nicht in Konidien statt, in denen das Signal teilweise nicht gut detektiert werden konnte. In Keimlingen und reifen Hyphen führt die Expression verschiedener *gfp(-c/saax)*-Fusionskonstrukte zu gut detektierbaren Fluoreszenzsignalen. Besonders in Keimlingen ist das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine die mit Hilfe des *tef-1*-Promotors exprimiert wurden im Vergleich zum

ccg-1-Promotor verbessert. In reifen Hyphen ist die Expression mit dem *tef-1*-Promotor gut, im Vergleich zum *ccg-1*-Promotor aber etwas schwächer.

Insgesamt ist die Auswahl an Promotoren, die für routinemäßige (Über)Expressionsexperimente in *N. crassa* genutzt werden können, trotz vielfältiger Bemühungen der *Neurospora*-Gemeinschaft noch begrenzt. Besonders reprimierbare Promotoren sind ein nützliches Werkzeug für die Erforschung von Genfunktionen. Erst kürzlich wurde der Kupfer-reprimierbare Promotor *ptcu* erfolgreich eingesetzt um die Genexpression auf kupferfreiem Medium zu induzieren und durch die Zugabe von Kupfer zu reprimieren. Western-Blot Analysen haben aber gezeigt, dass der Promotor *pccg-1* in Hyphen zu etwas höheren Protein-Mengen führt als der aktivierte Promotor *ptcu* [Lamb et al., 2013; Ouyang et al., 2015]. Gemeinsam zeigen diese Ergebnisse, dass es in *N. crassa* (noch) keinen idealen Promotor für alle Anwendungen gibt. Stattdessen sollte der Promotor für jedes Experiment sorgfältig dem jeweiligen Anwendungszweck entsprechend ausgesucht werden.

4.2.7. Menge und Aktivierungsstatus von MAK-2 und MEK-2 tragen vermutlich zur Spezifität der Zellantwort bei

Die Expression von *mak-2-gfp-caax* mit Hilfe des *tef-1*-Promotors führt im Wildtyp-Hintergrund zu einem dominant negativen Effekt während der Zell-Zell-Interaktionen. Die Interaktionsrate ist in den entsprechenden Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp reduziert und interagierende Keimlinge weisen überdurchschnittlich häufig einen *twisted phenotype* auf. Dieser Phänotyp ist dadurch gekennzeichnet, dass interagierende Keimlinge ihr Wachstum nach der Herstellung eines physischen Kontakts nicht einstellen, sondern aneinander lang wachsen oder sich umeinander wickeln. Der *twisted phenotype* wurde zuvor in einer $\Delta erg-2$ -Mutante beschrieben, die einen Defekt in der Biosynthese von Ergosterol aufweist. In Keimlingen dieser Mutante lokalisiert MAK-2 weiterhin an der Spitze der Keimschläuche, während diese umeinander wachsen. Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass MAK-2 in den Keimlingen des $\Delta erg-2$ -Stamms im Vergleich zu Wildtyp-Keimlingen über einen längeren Zeitraum aktiviert ist, was darauf hindeutet, dass MAK-2 an der wachsenden Spitze der sich umeinander wickelnden Keimlinge aktiviert vorliegt [Weichert et al., 2016]. Diese Daten ergänzen die Ergebnisse dieser Arbeit, in

der gezeigt wurde, dass die Membranlokalisierung von MAK-2 in reifen Hyphen zu einer Hyperphosphorylierung der Kinase führt. Die konsistente Aktivierung der membranlokalisierten Kinase in völlig verschiedenen genetischen Hintergründen und Entwicklungsstadien deutet daher stark darauf hin, dass es sich hierbei um einen allgemeinen Mechanismus handelt. Wenn die Membranlokalisation von MAK-2 *per se* zu einer Aktivierung der Kinase führt, betont dies wiederum die zentrale Bedeutung, die einer exakten Regulation der subzellulären Lokalisation für die Spezifität der Signalverarbeitung zukommt.

Interessanterweise weisen Keimlinge, die *mak-2-gfp-caax* mit Hilfe des nativen Promotors exprimieren, den *twisted phenotype* nicht auf und entwickeln sich vergleichbar zu den Keimlingen des Wildtyps. In diesen Stämmen lokalisiert MAK-2-GFP-CAAX nur sehr schwach an der Plasmamembran und ist in Keimlingen fluoreszenzmikroskopisch kaum zu visualisieren, was vermutlich auch mit einer schnellen Degradation der membrangebundenen Kinase zusammenhängt (siehe Abschnitt 4.2.5). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Menge von membrangebundenem bzw. aktiviertem MAK-2 einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion der Kinase und damit auf die intrazelluläre Signalweiterleitung hat und daher im Wildtyp genau reguliert werden könnte um die Spezifität der Zellantwort zu gewährleisten.

Im Einklang mit dieser Vermutung weisen Stämme, die eine membrangebundene Variante von MEK-2 enthalten, also der *Upstream*-Kinase von MAK-2, ein vergleichbares Muster auf. Wird *mek-2-gfp-caax* mit Hilfe des nativen Promotors im Wildtyp-Hintergrund exprimiert, zeigen die entsprechenden Stämme eine vergleichbare vegetative Entwicklung wie der Wildtyp, inklusive normal stattfindender Keimlingsinteraktionen. Wird *mek-2-gfp-caax* dagegen mit Hilfe des starken *tef-1*-Promotors überexprimiert, weisen die Keimlinge stark reduzierte Keimlingsinteraktionen auf und bilden reduzierte Lufthyphen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Menge der misslokalisierten Kinasen MAK-2 und MEK-2 in Anwesenheit der jeweiligen nativen Kinase einen erheblichen Einfluss auf die Wirkung der Misslokalisierung für die vegetative Entwicklung von *N. crassa* hat.

4.2.8. Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade könnten direkt mit Komponenten des Polarisoms interagieren und das gerichtete Wachstum interagierender Keimlinge vermitteln

Die Überexpression von *mek-2-gfp-caax* führt zu einem starken Polaritätsdefekt in Keimlingen. Dieser Defekt fällt in Keimlingen des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*), der zusätzlich die native Kinase MEK-2 aufweist, wesentlich milder aus als in Keimlingen der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, Δmek-2*), die *mek-2-gfp-caax* im *mek-2*-Deletionshintergrund exprimieren. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die native Kinase die Defekte teilweise kompensieren kann. Der leichte Polaritätsdefekt des Stammes MT-35-330 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*) äußert sich durch rundliche Bereiche in insgesamt polar wachsenden Keimschläuchen. Die Interaktionsrate zwischen den Keimlingen ist im Vergleich zum Wildtyp oder dem *mek-2-gfp*-exprimierenden Kontrollstamm stark reduziert. Keimlinge der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, Δmek-2*) weisen dagegen einen deutlich stärkeren Polaritätsdefekt auf. Nach dem Keimen weisen die Keimschläuche abwechselnd starkes isotropes und kurzfristig polares Wachstum auf, so dass während des Wachstums „Perlenkettenschnur“-artige Strukturen entstehen. Interaktionen oder Fusionen wurden zwischen diesen Strukturen nicht beobachtet. Nach etwa 8 - 10 Stunden stabilisiert sich das polare Wachstum und es bilden sich reife Hyphen ohne ausgeprägte Polaritätsdefekte.

In *N. crassa* und anderen filamentösen Pilzen wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, die eine Rolle bei der Zellpolarität spielen. Die Deletionsmutanten oder temperatursensitiven Mutanten der entsprechenden Gene wurden auf morphologische Besonderheiten untersucht und die Genprodukte in der lebenden Zelle lokalisiert. Trotz der umfangreichen Daten, die über eine Vielzahl von Faktoren verfügbar sind, ist weiterhin wenig über das Zusammenspiel dieser Faktoren und die molekularen Mechanismen die bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität eine Rolle spielen bekannt [Lichius et al., 2012b; Riquelme et al., 2014; Riquelme and Martínez-Núñez, 2016]. Die Beschreibung des starken Polaritätsdefektes von Keimlingen der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, Δmek-2*) in dieser Arbeit bietet daher für die Zukunft eine gute Möglichkeit, um mehr über die molekularen Mechanismen der Etablierung und Aufrechterhaltung von Polarität und ihrer Regulation in *N. crassa* zu lernen.

Besonders interessant ist die Beobachtung, dass der Polaritätsdefekt nur Keimlinge und keine reifen Hyphen betrifft. Ein offensichtlicher Unterschied zwischen diesen beiden Entwicklungsstadien ist das Vorhandensein eines Spitzenkörpers in reifen Hyphen. Während in Keimlingen Komponenten des Polarisoms eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von polarem Wachstum zukommt, wird diese Aufgabe in reifen Hyphen vermutlich durch das Polarisom und den Spitzenkörper übernommen [Araujo-Palomares et al., 2007; Lichius et al., 2012b; Riquelme and Martínez-Núñez, 2016]. Darüber hinaus unterscheiden sich Hyphen und Keimlinge unter anderem durch eine unterschiedliche räumliche Anordnung von Zellkernen, Komponenten des Polarisoms, der Exo- und Endocytose und des Aktincytoskeletts [Araujo-Palomares et al., 2007; Lichius et al., 2012b; Berepiki et al., 2011].

Die Polymerisierung von Aktin ist für polares Wachstum essentiell [Riquelme and Martínez-Núñez, 2016]. Versuche mit den Aktin-Inhibitoren Latrunculin A oder Cytochalasin A führten beispielsweise in *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Ashbya gossypii* und *N. crassa* zu einem Anschwellen der wachsenden Zellspitzen [Torralba et al., 1998; Crampin et al., 2005; Knechtle et al., 2006; Sánchez-León et al., 2011]. Darüber hinaus wurden Mutationen in den zu Bni1 aus *S. cerevisiae* homologen Forminen, die Aktin polymerisieren, in *A. nidulans*, *C. albicans* und *A. gossypii* mit geschwollenen Konidien und Hyphen assoziiert [Berepiki et al., 2011]. Das teilweise isotrope Wachstum von Keimlingen der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) könnte daher auf eine veränderte Aktinnukleation in Keimlingen hindeuten. Um diese Hypothese zu untersuchen könnte Aktin mit fluoreszenzmarkierten Aktin-Markern wie *Lifeact* in *mek-2-gfp-caax*-überexprimierenden Keimlingen beobachtet und mit Keimlingen des Wildtyps verglichen werden. Eine veränderte Lokalisation der Aktinfilamente während der isotropen Wachstumsphasen könnte diese Vermutung bestätigen oder widerlegen. Es wurde zuvor vorgeschlagen, dass der Spitzenkörper in reifen Hyphen ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Organisation von Aktin übernimmt, was gemeinsam mit der steigenden Bedeutung von Mikrotubuli in reifen Hyphen zur Stabilisierung der Polarität in reifen Hyphen der Stämmen MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, Δ *mek-2*) beitragen könnte [Berepiki et al., 2011].

Wenn der Polaritätsdefekt der Keimlinge auf eine veränderte Aktinnukleation zurückgeführt werden könnte, würde sich weiterhin die Frage stellen, durch welchen Mechanismus die Po-

lymerisierung von Aktin in den entsprechenden Stämmen verändert werden könnte. Die Nukleation von Aktin geschieht in *N. crassa* mit Hilfe des Formins BNI-1. Im Gegensatz zu der Hefe *S. cerevisiae*, dem dimorphen Pilz *C. albicans* und dem als filamentöser Pilz wachsenden *A. gossypii* besitzt *N. crassa* nur ein einziges Formin, dessen Deletion lethal ist [Justa-Schuch et al., 2010; Berepiki et al., 2011]. Eine mögliche veränderte Aktin-Polymerisation in Keimlingen der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) könnte daher direkt mit BNI-1 zusammenhängen, oder auf regulatorische *Upstream*-Komponenten zurückzuführen sein. Darüber hinaus könnten die beobachteten Defekte direkt durch die Misslokalisierung von MEK-2 verursacht werden oder ein indirekter Effekt durch eine zeitliche, räumliche oder von der Signalstärke veränderte Aktivierung der MAP-Kinase MAK-2 sein (Abschnitt 4.2.4). Zu dem jetzigen Zeitpunkt bleiben die Vermutungen spekulativ und müssen durch weitere Experimente untersucht werden. Als zukünftige Ideenquelle für weiterführende Untersuchungen werden im folgenden zwei spekulative Wirkungsmechanismen auf verschiedenen Hierarchie-Ebenen aus Daten aus der Hefe *S. cerevisiae* abgeleitet und durch einfache experimentelle Vorschläge ergänzt.

Der erste vorgeschlagene Wirkungsmechanismus könnte auf einer direkten Interaktion zwischen MEK-2 und SPA-2, dem Gerüstprotein des Polarisoms, beruhen (Abbildung 4.2). In der Hefe *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass Spa2 in einem *Yeast-Two-Hybrid*-Experiment mit der zu MEK-2 homologen MAPKK Ste7 interagiert [Sheu et al., 1998]. Auf Grund der Beobachtung, dass Ste7 während des *Matings* teilweise unabhängig von dem Gerüstprotein Ste5 an die Plasmamembran rekrutiert wird, wurde Spa2 als möglicher zusätzlicher Rekrutierungsfaktor für die MAPKK vorgeschlagen [Maeder et al., 2007]. Analog hierzu könnte in *N. crassa* eine Interaktion zwischen MEK-2 und SPA-2 stattfinden, die bei der permanenten Misslokalisierung von MEK-2-GFP-CAAX an der Plasmamembran konsequenterweise auch zu einer Missrekrutierung von SPA-2 an die gesamte Plasmamembran führen könnte. Da SPA-2 ein Gerüstprotein für die Komponenten des Polarisoms darstellt, könnte dies die Bildung von Polaritätsclustern erschweren, die für polares Wachstum essentiell sind. In Anwesenheit der nativen Kinase könnte diese dabei helfen einen frei beweglichen SPA-2-*Pool* beizubehalten, der an entstehende Polaritäts-*Cluster* rekrutiert werden und somit den Polaritätsdefekt verringern könnte. Um die Hypothese einer Missrekrutierung von SPA-2 durch die membrangebundene Kinasevariante

MEK-2-GFP-CAAX zu untersuchen, könnten die Polarisom-Komponenten SPA-2 und das Formin BNI-1 in Keimlingen der *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämme lokalisiert werden. Eine Lokalisation dieser beiden Proteine an der gesamten Plasmamembran würde diese Hypothese unterstützen.

Der zweite vorgeschlagene Wirkungsmechanismus könnte auf einer Regulation der Aktivität von BNI-1 durch MAK-2 beruhen (Abbildung 4.2). Daten aus der Hefe *S. cerevisiae* deuten darauf hin, dass die aktivierte MAP Kinase Fus3 das Formin Bni1 durch eine Phosphorylierung aktiviert und somit einen von Far1 und Cdc42 unabhängigen Beitrag zu polarem Wachstum leistet [Matheos et al., 2004]. Es wurde vorgeschlagen, dass Fus3 während der Aktivierung von Bni1 mit der $G\alpha$ -Untereinheit des trimeren G-Proteins interagiert und hierdurch dazu beiträgt das polare Wachstum der *Shmoos* in die Richtung des höchsten Pheromongradienten zu lenken [Matheos et al., 2004]. Im Gegensatz zu der Hefe ist in *N. crassa* kein zu Far1 homologes Protein vorhanden [Borkovich et al., 2004]. Ebenso sind die *Upstream*-Komponenten des MAP-Kinasen-Moduls unbekannt. Es ist daher in *N. crassa* völlig offen, wie der Eingang des putativen chemotropen Signal mit gerichtetem Wachstum verbunden wird. Eine direkte Phosphorylierung von BNI-1 durch MAK-2 ist daher eine attraktive Hypothese, die erklären könnte, wie das Erkennen eines chemotropen Signals in *N. crassa* direkt mit der Zellantwort des gerichteten Wachstums verknüpft werden könnte. Wie bereits beschrieben wurde deuten einige Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass eine Membranrestriktion von MEK-2 unabhängig von einem eingehenden chemotropen Signal zu einer permanenten Aktivierung von MAK-2 an der gesamten Plasmamembran führen könnte (Abschnitt 4.2.4). Im Einklang hiermit könnte die permanent aktivierte MAP-Kinase MAK-2 das Formin BNI-1 unabhängig von einem chemotropen Signal permanent an der gesamten Plasmamembran aktivieren, was zu isotropem Wachstum führen und den Polaritätsdefekt der *mek-2-gfp-caax*-exprimierenden Stämme erklären würde. Um diese Hypothese zu testen wäre es interessant eine nicht-phosphorylierbare Kinasevariante über einen Farnesylanker permanent an die Plasmamembran zu rekrutieren. Einfacher aber nicht ganz so direkt wäre es *mek-2-gfp-caax* in einer $\Delta nrc-1$ -Mutante zu exprimieren, in der das für die *Upstream*-Kinase kodierende Gen deletiert wurde. Zeigen die entsprechenden Mutanten keinen Polaritätsdefekt auf, würde dies zeigen, dass die Aktivität der Kinase den Polaritätsdefekt verursacht, was im Einklang mit der hier vorgeschlagenen Hypothese stehen

würde. Zeigen die entsprechenden Mutanten dagegen weiterhin einen Polaritätsdefekt, würde dies zeigen, dass die Aktivität von MEK-2 hierfür nicht notwendig ist, was eine permanente Aktivierung von MAK-2 ausschließen und die hier vorgeschlagene Hypothese widerlegen würde.

4.2.9. Regulation der vegetativen und sexuellen Zell-Zell-Kommunikation

Trotz der Bedeutung, die Zellfusionen für eine gesunde Entwicklung und die Entstehung von Krankheiten haben, bleiben die molekularen Grundlagen und die genetische Regulation der zugrundeliegenden Prozesse zu einem großen Teil unverstanden [Oren-Suissa and Podbilewicz, 2007; Willkomm and Bloch, 2015]. In dem filamentösen Pilz *N. crassa* finden verschiedene Zellfusionen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien statt. Keimlingsfusionen sind bei der frühen Etablierung einer Kolonie beteiligt und vegetative Hyphenfusionen tragen zur vernetzten Struktur reifer Myzelien bei. Während des sexuellen Lebenszyklus fusioniert die Trichogyne mit einer Zelle des entgegengesetzten Paarungstyps und nimmt einen Zellkern auf. Im Inneren der Protoperithezien fusionieren Zellen des Hakens miteinander. Darüber hinaus ist es noch nicht vollständig geklärt, ob vegetative Fusionsereignisse zur Bildung der Protoperithezien beitragen [Fleissner et al., 2008; Lichius et al., 2012a].

Zellfusionen werden - je nachdem ob die fusionierenden Zellen genetisch identisch sind oder nicht - als *self fusion* oder *non-self fusion* bezeichnet. In den letzten 15 Jahren wurden in *N. crassa* zahlreiche Gene identifiziert, die eine Rolle bei der vegetativen *self fusion* spielen. Dabei ist auffällig, dass fast alle Mutanten, in denen für die Keimlingsfusion essentielle Gene deletiert sind, bestimmte phänotypische Merkmale teilen. In den entsprechenden Mutanten finden keine Hyphenfusionen im Inneren der Kolonie statt, es werden nur kurze Lufthyphen gebildet und die meisten dieser Mutanten sind weiblich steril, aber männlich fertil. Dieser letzte Punkt deutet auf der einen Seite an, dass die genetische Regulation von vegetativen und sexuellen Fusionsereignissen ähnlich ist, da Fusionsmutanten meist Defizite in beiden Prozessen aufweisen. Auf der anderen Seite zeigt dieser Punkt aber auch einen grundlegenden Unterschied zwischen den vegetativen und den sexuellen Fusionsereignissen an: Vor der vegetativen Zellfusion findet eine bilaterale Kommunikation zwischen den Fusionspartnern statt, in denen beide Zellen ein Signal sowohl senden, als auch empfangen [Fleissner et al., 2009;

Lichius and Lord, 2014]. Im Gegensatz dazu ist die Kommunikation zwischen der weiblichen Trichogyne und dem männlichen Zellkernspender ein unilateraler Prozess. Der männliche Zellkernspender sekretiert ein Pheromon und die Trichogyne erkennt das Signal und passt ihr Wachstum entsprechend an. Bei der sexuellen Zellfusion sind sowohl die Pheromone, als auch die Rezeptoren bekannt. Darüber hinaus werden alle drei in *N. crassa* vorhandenen MAP-Kinasen-Module bei der sexuellen Entwicklung benötigt, während bei der vegetativen Zellfusion nur zwei der drei MAP-Kinasen-Kaskaden essentiell sind [Kim et al., 2012; Lichius and Lord, 2014]. Die Pheromone und Pheromon-Rezeptoren spielen für die vegetative Zellkommunikation keine Rolle. Andersrum spielt beispielsweise das für die vegetative Zellfusion essentielle Gen *so* keine Rolle für das chemotrope Wachstum der Trichogyne und der Fusion mit dem Zellkernspender. Diese Unterschiede spiegeln vermutlich die unilateralen und bilateralen Kommunikationsmechanismen der sexuellen und vegetativen Zellfusion wieder [Fleissner et al., 2005; Lichius and Lord, 2014].

In dieser Arbeit wurde ein Mutante beschrieben, die eine membrangebundene Variante der MAPKK MEK-2 exprimiert. Keimlinge der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) weisen im Vergleich zum Wildtyp stark veränderte Polaritätsmuster auf und es wurden keine interagierenden Keimlinge beobachtet. Ungewöhnlicherweise sind diese Stämme dennoch weiblich und männlich fertil. Im Vergleich zum Wildtyp bilden sie allerdings deutlich weniger Protoperithezien, diese entwickeln sich langsamer als im Wildtyp zu reifen Perithezien und zeigen häufig ungewöhnliche Morphologien mit einer reduzierten Melanisierung, der Bildung mehrerer Perithezien-Hälse und einer ungewöhnlichen Ausrichtung der Hälse, die seltener zum Licht orientiert sind und stattdessen häufiger seitlich in den Agar wachsen. Im Einklang mit der reduzierten Bildung von Perithezien und den morphologischen Abweichungen vom Wildtyp produzieren die Stämme im Vergleich zum Wildtyp auch deutlich weniger Askosporen. Diese keimen unter geeigneten Bedingungen aus und treten in den vegetativen Lebenszyklus ein, womit der sexuelle Lebenszyklus komplett abgeschlossen ist. Es wäre möglich, dass der Kommunikationsdefekt zwischen Keimlingen der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax*, $\Delta mek-2$) auf dem starken Polaritätsdefekt der Keimlinge beruht, der eine Differenzierung der Keimlinge zu fusionskompetenten Zellen verhindert. Für diese Hypothese spricht auch die Beobachtung, dass Hyphen dieser Stämme keine Polaritätsdefekte auf-

weisen und in der Lage sind miteinander zu kommunizieren und zu fusionieren. Diese Beobachtung könnte auch erklären, weshalb der sexuelle Zyklus in diesen Stämmen - im Gegensatz zu fast allen anderen bekannten Fusionsmutanten, in denen die Keimlingsinteraktionen komplett unterbrochen sind - vollständig durchlaufen wird. Die Defekte in der Keimlingsfusion würden also durch einen toxischen Effekt von zu viel membrangebundener MAPKK MEK-2 und nicht direkt durch einen Funktionsverlust der Kinase entstehen. Im Einklang mit dieser Hypothese steht auch die Beobachtung, dass die Expression von *mek-2-gfp-caax* durch den nativen Promotor auch im *mek-2*-Deletionshintergrund die Keimlingsinteraktionen stark reduziert aber nicht komplett verhindert. Der entsprechende Stamm MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax, Δmek-2*) durchläuft den sexuellen Zyklus ebenfalls komplett bis zur keimenden Askospore. Die Defekte während der sexuellen Entwicklung der Stämme MT-43-286 und MT-43-287 (*ptef-1-mek-2-gfp-caax, Δmek-2*) scheinen im Vergleich zu den Defekten des Stammes MT-42-279 (*pmek-2-mek-2-gfp-caax, Δmek-2*) qualitativ ähnlich zu sein (Abschnitt 3.3.9 und [Thieme, 2014]). Gemeinsam zeigen diese Ergebnisse, dass die subzelluläre Dynamik der MAPKK MEK-2 sowohl für die vegetative als auch für die sexuelle Entwicklung nicht essentiell ist. Die partielle Komplementation der vegetativen und sexuellen Defekte der *mek-2*-Deletionsmutante durch die Expression von *mek-2-gfp-caax* deutet aber darauf hin, dass die Dynamik zur Funktion von MEK-2 beiträgt oder die Kinase weitere Aufgaben in anderen Kompartimenten als der Plasmamembran ausübt.

4.3. Der „Zelldialog“ : Spezifität und Robustheit durch zeitlich-räumliche Koordinations-Mechanismen

Das steigende Bewusstsein für die Bedeutung von Zellfusionen für eine gesunde Entwicklung und die Entstehung von Krankheiten hat in den letzten Jahren zu einem Aufschwung in der Zellfusionsforschung beigetragen [Oren-Suissa and Podbilewicz, 2010; Herzog et al., 2015]. In *N. crassa* wurden in den letzten Jahren zahlreiche Faktoren identifiziert, die für die Kommunikation zwischen interagierenden Zellen und die Zellfusion selber von Bedeutung sind [Lichius and Lord, 2014]. Auf der Basis von Lokalisierungsstudien der für die Zellfusion essentiellen MAP-Kinase MAK-2 und SO, einem Protein mit noch unbekannten molekularen Funktionen,

wurde das Modell des „Zelldialogs“ aufgestellt [Fleissner et al., 2009]. In dieser Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation der *Upstream*-Kinasen MEK-2 und NRC-1 bestimmt und Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der Lokalisation, der Aktivität und der Funktion der Kinasen durchgeführt. Hierdurch konnten einige Hypothesen des „Zelldialog“-Modells bestätigt und neue Hypothesen aufgestellt werden. Während der Entstehung dieser Arbeit haben weitere Studien zu unserem Verständnis der Zell-Zell-Kommunikation in Keimlingen und Hyphen von *N. crassa* beigetragen. Gemeinsam führen diese Daten zu einer Erweiterung des Modells des „Zelldialogs“ (Abbildung 4.2).

Keimen zwei oder mehr Sporen von *N. crassa* in räumlicher Nähe zueinander aus, wachsen sie gerichtet aufeinander zu und fusionieren. Für die Anpassung der Wachstumsrichtung ist eine Kommunikation zwischen beiden Keimlingen über eine räumliche Distanz unerlässlich. Da die interagierenden Keimlinge potentiell genetisch identisch sind, sekretieren und empfangen sie vermutlich den identischen Chemoattraktanten. Das Modell des „Zelldialogs“ schlägt einen Mechanismus vor, in dem die Zellen abwechselnd „reden“ (Signal senden) und „zuhören“ (Signal empfangen), wodurch eine Selbststimulation durch den sekretierten Chemoattraktanten erfolgreich vermieden werden kann [Fleissner et al., 2009].

Auf molekularer Ebene beginnt die Initiierung des Zelldialogs vermutlich mit dem Binden eines vorhergesagten Chemoattraktanten an einen noch unbekannten Rezeptor, der das Signal ins Zellinnere weiterleitet. Dort findet die intrazelluläre Signaltransduktion mit Hilfe der in der Hefe *S. cerevisiae* und anderen Eukaryoten konservierten MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade statt. Die Faktoren, die zu einer Aktivierung des MAP-Kinasen-Moduls führen sind in *N. crassa* noch nicht identifiziert [Pandey et al., 2004; Lichius and Lord, 2014]. Die in dieser Arbeit gezeigte Hyperphosphorylierung der permanent membrangebundenen Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX deutet aber stark darauf hin, dass die Aktivierung hauptsächlich an der Plasmamembran stattfindet, während eine Deaktivierung der Kinase räumlich getrennt im Cytoplasma und Zellkern stattfinden könnte (Abschnitt 3.3.5, 4.2.3, 4.2.4 und [Maeder et al., 2007]). Im Einklang mit einer Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade an der Plasmamembran haben Lokalisierungsstudien in dieser und anderen Arbeiten gezeigt, dass MAK-2, MEK-2 und vermutlich NRC-1 während der Keimlingsinteraktion gleichzeitig mit dem Gerüstprotein HAM-5 und dem Adapterprotein STE-50 an die Plasmamembran rekrutiert werden (Abschnitt 4.1.1 und [Fleissner et al., 2009];

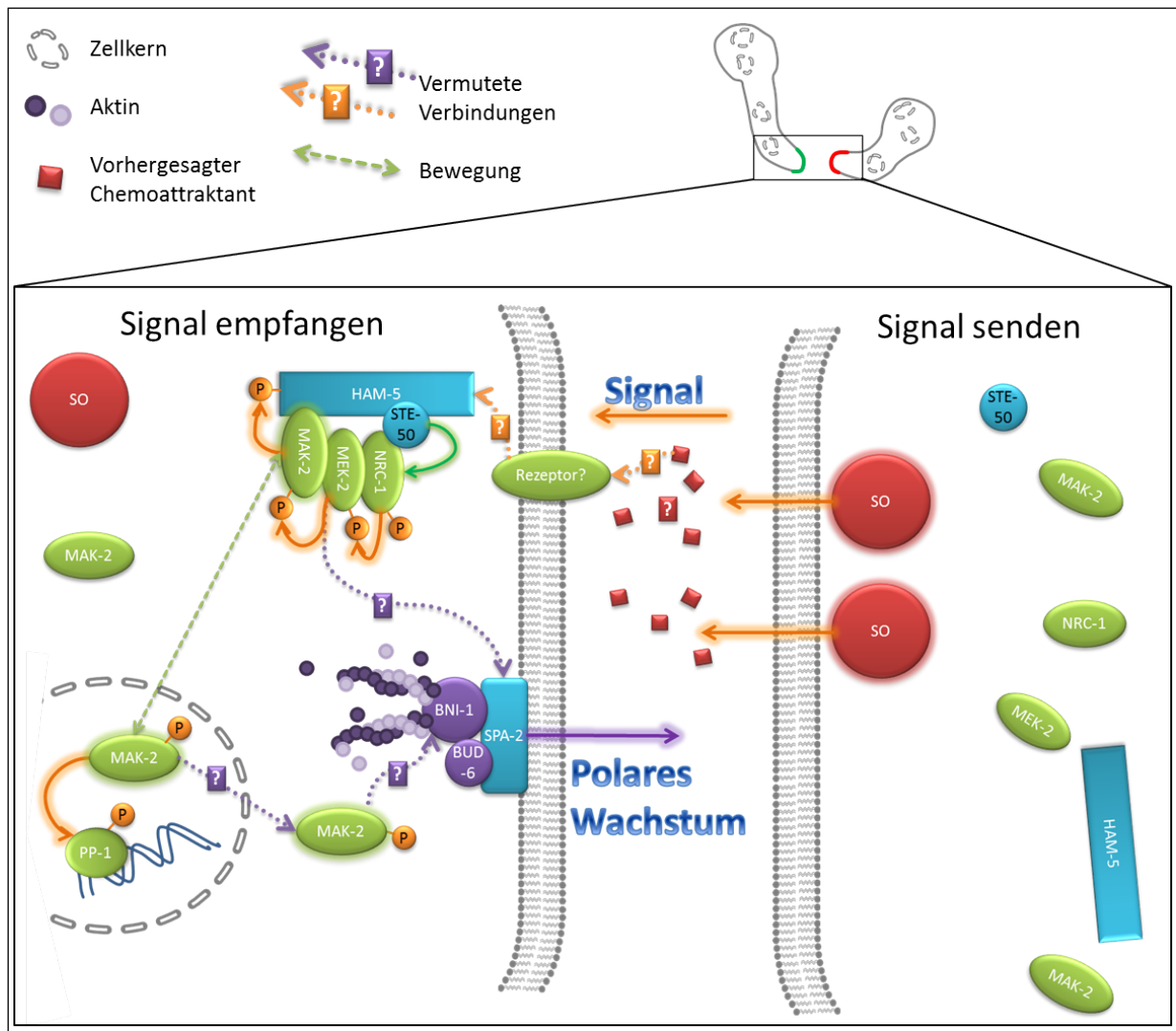


Abbildung 4.2.: Das Modell des „Zelldialogs“

Aktuelles Modell der intrazellulären Signalweiterleitung während des gerichteten Wachstums interagierender Keimlinge. Die Interaktionspartner wechseln zwischen zwei physiologischen Zuständen, die mit dem Senden (rot, rechter Keimling) und Empfangen (grün, linker Keimling) eines chemotropen Signals in Verbindung gebracht werden. In der Signal-sendenden Zelle wird ein unbekannter Chemoattraktant pulsartig entlassen, während das Protein SO an der Plasmamembran lokalisiert. HAM-5, STE-50 und die drei MAP-Kinasen lokalisieren in dieser Zelle cytoplasmatisch. Der Chemoattraktant wird von der Signal-empfangenden Partnerzelle wahrgenommen. Die Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls werden mit dem Gerüstprotein HAM-5 an die Plasmamembran rekrutiert und leiten das ankommende Signal intrazellulär weiter, was schließlich in der Zellantwort des gerichteten Wachstums zur Partnerzelle resultiert. Die MAP-Kinase MAK-2 wandert während ihrer Aktivierung und der Phosphorylierung von Ziel-Proteinen durch verschiedene subzelluläre Kompartimente, was vermutlich zur Sensitivität und Spezifität der Zellantwort beiträgt. Die Aktivität der Kinase wird durch mehrere größtenteils unbekannte negative und positive Feedback-Mechanismen reguliert und beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von Proteinen, darunter SO und möglicherweise BNI-1. Nach wenigen Minuten wechseln die Partnerzellen ihre physiologischen Modi. Die Zelle, die zuvor ein Signal gesendet hat wird nun zur Empfängerzelle und die Zelle, die zuvor das Signal empfangen hat sendet jetzt das noch unbekannte Signal. Dieser Wechsel vollzieht sich mehrere Male, bis die interagierenden Keimlinge sich berühren.

Jonkers et al., 2014; Dettmann et al., 2014]). Nach der Aktivierung der MAPKKK NRC-1 phosphoryliert und aktiviert diese die MAPKK MEK-2, die hierdurch aktiviert wird und daraufhin die MAPK MAK-2 phosphoryliert. Bei der Aktivierung der MAP-Kinase spielen vermutlich ein oder mehrere positive Feedback-Mechanismen eine Rolle, die auf einer Verstärkung der Signaltransduktion durch aktiviertes MAK-2 oder durch eine räumliche Trennung der aktivierenden von den deaktivierenden Faktoren beruhen könnten (Abschnitt 4.2.3). Aktiviertes MAK-2 phosphoryliert vermutlich das Gerüstprotein HAM-5. Obwohl eine genaue Funktion hierfür bisher nicht bekannt ist, wurde vorgeschlagen, dass dies zu einer Auflösung des HAM-5/Kinasen-Komplexes führen könnte [Jonkers et al., 2014]. Die Auflösung des Komplexes durch die aktivierte Kinase könnte einen negativen Feedback-Mechanismus darstellen, durch den die Signalweiterleitung begrenzt wird.

Die aktivierte MAP-Kinase MAK-2 transloziert anschließend vermutlich in den Zellkern, wo sie durch eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors PP-1 die Expression von Zell-Zell-Kommunikations- und -Fusions-spezifischen Genen regulieren könnte (Abschnitt 4.2.1 und [Leeder et al., 2013]). Daten aus dieser Arbeit deuten stark darauf hin, dass dieser Schritt essentiell für die Zell-Zell-Kommunikation ist, da die Expression eines für die permanent membrangebundene Kinasevariante MAK-2-GFP-CAAX kodierenden Fusionsgens die Defekte der *mak-2*-Deletionsmutante nicht komplementiert (Abschnitt 3.3.3). Weitere Aufgaben der Kinase könnten mit der Regulation des Zellzyklus und polarem Wachstum zusammenhängen (Abschnitt 4.2.8 und [Fleissner and Serrano, 2016]). Während des *Matings* in der Hefe *S. cerevisiae* induziert die zu MAK-2 homologe MAP-Kinase Fus3 im Zellkern durch die Phosphorylierung des Gerüstproteins Far1 den Zellzyklus-Arrest [Bardwell, 2005; Chen et al., 2010]. Dies ist eine nötige Voraussetzung für die Bildung der *Shmoos*, wobei Far1 eine essentielle Rolle bei der Ausrichtung des polaren Wachstums in Richtung des höchsten Pheromon-Gradienten übernimmt. Um diese zweite Aufgabe zu erfüllen ist es entscheidend, dass Far1 den Zellkern verlässt [Valtz et al., 1995; Blondel et al., 1999]. Dieser Vorgang wird durch aktiviertes Fus3 reguliert und muss für eine Erfassung des Pheromon-Gradienten exakt dosiert werden. Cytoplasmatisches Far1 interagiert an der Plasmamembran mit $G\beta\gamma$ und rekrutiert dadurch den gebundenen GEF Cdc24 an die Plasmamembran, wo er die Rho-GTPase Cdc42 aktiviert. Cdc42 ist ein zentraler Zellpolaritätsfaktor, der unter anderem durch die Aktivierung

des Formins Bni1 polares Wachstum koordiniert. Durch die Verbindung zwischen der kleinen Rho-GTPase Cdc42 und der $G\beta\gamma$ -Untereinheit des trimeren G-Proteins verknüpft Far1 also das einkommende Pheromon-Signal mit gerichtetem Wachstum [Bi and Park, 2012; Hegemann et al., 2015]. Darüber hinaus reguliert Fus3 die Lokalisation und Aktivität von Bni1 vermutlich auch durch eine direkte Phosphorylierung des Formins, was zusätzlich zur Ausrichtung des polaren Wachstums beiträgt [Matheos et al., 2004].

Vergleichbare Mechanismen könnten auch in *N. crassa* eine Rolle spielen, obwohl in dem Genom kein homologes Protein zu Far1 identifiziert wurde [Borkovich et al., 2004]. Mikroskopische Untersuchungen haben aber gezeigt, dass auch in *N. crassa* während der Keimlingsinteraktionen keine Kernteilung stattfindet, und es wurde vorgeschlagen, dass dieser Arrest durch das Erkennen des unbekannten Chemoattraktanten ausgelöst wird [Roca et al., 2010]. Es wäre daher möglich, dass MAK-2 auch in *N. crassa* einen Arrest im Zellzyklus über putative Substrate im Zellkern regulieren könnte. Ob in *N. crassa* Substrate mit einer vergleichbaren dualen Funktion wie Far1 existieren oder diese beiden Aufgaben von unabhängigen Proteinen ausgeführt werden könnten, ist nicht bekannt. Es ist aber anzunehmen, dass das intrazelluläre Signal auch in *N. crassa* teilweise über den Zellkern zurück an die Plasmamembran geleitet wird, um die Wachstumsrichtung der Keimlinge chemotrop auszurichten. Auf Grund der oszillatorischen Dynamik von MAK-2 wandert die Kinase vom Zellkern und Cytoplasma wieder an die Plasmamembran. Es wäre daher in *N. crassa* vielleicht auch möglich, dass die Kinase selber das Signal teilweise zurück an die Plasmamembran bringt. Die Wanderung eines Teils der vorhandenen Kinasen-Moleküle durch das Cytoplasma und den Zellkern - Kompartimente, in denen sich vermutlich die deaktivierenden Phosphatasen befinden - könnte in diesem Modell dabei helfen, ein Gleichgewicht zwischen aktivierter und nicht-aktivierter Kinase herzustellen, das zur exakten Ausrichtung des polaren Wachstums beitragen könnte. Im Einklang mit dieser Vermutung wurde in dieser Arbeit eine Verbindung zwischen Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade und der Zellpolarität gezeigt. Eine permanente Membranrestriktion der MAPKK MEK-2 führt zu einem Polaritätsdefekt in Keimlingen (Abschnitt 3.3.6). Auch wenn die Zusammenhänge bisher spekulativ sind, wäre eine Erklärungsmöglichkeit im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, dass die Misslokalisierung von MEK-2 zu einer Missaktivierung von MAK-2 führen und hierdurch den Polaritätsdefekt durch eine fehlerhafte

Regulierung des Formins BNI-1 auslösen könnte (Abschnitt 4.2.8). Die Identifizierung weiterer Substrate von MAK-2 im Zellkern und an der Plasmamembran könnte die Verbindung zwischen dem Signaleingang und der Umwandlung in chemotropes Wachstum aufdecken und ist daher ein wichtiger Baustein der zukünftig zum Verständnis der Zell-Zell-Kommunikation und -Fusion beitragen könnte.

Der Wechsel eines Keimlings von einem physiologischen Zustand in den nächsten, also vom Signal-Empfangen in den Modus des Signal-Sendens, könnte ebenso wie der Wachstumstopp nach einer Berührung der Keimlinge durch die Aktivität der MAP-Kinase MAK-2 reguliert werden. Das Senden des unbekannten chemotropen Signals wurde in dem „Zelldialog“-Modell mit einer Lokalisation des Proteins SO an der Spitze des entsprechenden Keimlings assoziiert. Dabei wird vermutet, dass das Signal pulsartig ausgeschüttet wird, möglicherweise durch eine synchrone Entlassung aus Vesikeln die zuvor an die Plasmamembran transportiert wurden [Goryachev et al., 2012]. Während des „Zelldialogs“ deutet die exakt gegenläufige Oszillation von SO und MAK-2 an den Spitzen interagierender Keimlinge darauf hin, dass beide Proteine nicht zeitgleich an einer Keimlingsspitze vorkommen, und sich also gegenseitig ausschließen könnten [Fleissner et al., 2009; Lemanski, 2010]. Es wurde zuvor bereits gezeigt, dass die Aktivität von MAK-2 die Lokalisation von SO beeinflusst, wobei eine Inhibierung der Kinaseaktivität von MAK-2 zu einer Akkumulation von SO an der gesamten Plasmamembran von Keimlingen führt und das Wachstum in den entsprechenden Keimlingen beendet. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine permanent membrangebundene MAK-2-Kinasevariante in Hyphen hyperphosphoryliert vorliegt und in Anwesenheit der nativen Kinase in interagierenden Keimlingen häufig zu einem *twisted phenotype* führt, der mit einem verlängerten Wachstum und vermutlich einer Hyperphosphorylierung der membrangebundenen MAK-Kinasevariante an den Spitzen der Keimschläuche einhergeht (Abschnitt 3.3.5 und 3.3.4). Interessanterweise wurde in interagierenden Keimlingen beobachtet, dass SO nicht effizient an die Plasmamembran interagierender Keimlinge rekrutiert wird, an denen MAK-2-GFP-CAAX lokalisiert [Serrano, persönliche Mitteilung]. Im Einklang hierzu wurde auch in der $\Delta erg-2$ -Mutante, in der der *twisted phenotype* ursprünglich beschrieben wurde, gezeigt dass SO in Keimlingen mit einem *twisted phenotype* (in denen MAK-2 weiterhin an der wachsenden Keimlingsspitze akkumuliert und vermutlich ebenfalls phosphoryliert vorliegt) nur schwach in Punkten verteilt über die Plas-

Plasmamembran lokalisiert [Weichert et al., 2016]. Insgesamt stehen diese Ergebnisse im Einklang mit der zuvor gemachten Beobachtung, dass die Aktivität von MAK-2 die Lokalisation von SO beeinflusst. Während zuvor gezeigt wurde, dass die Deaktivierung der Kinase zu einer Lokalisation von SO an der gesamten Plasmamembran von Keimlingen führt, deuten andersrum die hier diskutierten Ergebnisse darauf hin, dass die Aktivierung der Kinase eine effiziente Lokalisation von SO verhindert (Abschnitt 3.3.5 und [Fleissner et al., 2009; Weichert et al., 2016]). Übereinstimmend führt die zeitlich missregulierte Aktivität der Kinase in zwei völlig verschiedenen Ansätzen (einer veränderten Zusammensetzung der Membranlipide in der $\Delta erg-2$ -Mutante und einer künstlichen Membranlokalisierung von MAK-2-GFP--CAAX) zu einer Reduktion der Keimlingsinteraktion und einem sehr spezifischen *twisted phenotype*.

Der *twisted phenotype* in Keimlingen der *mak-2-gfp-caax*-überexprimierenden Stämme und der *erg-2*-Deletionsmutante geht mit einem verlängerten Wachstum der Keimschläuche einher. Während Keimlinge des Wildtyps ihr Wachstum einstellen sobald die Interaktionspartner physischen Kontakt hergestellt haben, setzen Keimlingspaare mit einem *twisted phenotype* ihr Wachstum auch nach einer Berührung der Interaktionspartner fort. Gleichzeitig bleibt MAK-2 in den entsprechenden Keimlingen über einen längeren Zeitraum aktiviert. Gemeinsam deuten diese Daten daher darauf hin, dass Keimlinge mit einem *twisted phenotype* einen Defekt bei dem Übergang vom gerichteten Zellwachstums zum Wachstumsstopp nach einer Erkennung des Zell-Zell-Kontakts aufweisen, und dass dieser Defekt mit einer erhöhten Aktivität von MAK-2 einhergeht (Abschnitt 3.3.4, 3.3.5 und [Weichert et al., 2016]). In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit der nicht-aktivierbaren Kinasevariante MAK-2(T180A)(Y182F)-GFP, in der die putativen MEK-2-Phosphorylierungsstellen gegen nicht-phosphorylierbare Aminosäuren getauscht wurden [Lunding, 2013], wurde beobachtet, dass diese Kinasevariante in interagierenden Keimlingen (in denen die native Kinase ebenfalls vorhanden ist) nicht an die Plasmamembran rekrutiert wird. Nachdem die Interaktionspartner sich berühren akkumuliert MAK-2(T180A)(Y182F)-GFP am zukünftigen Fusionspunkt [Serrano, persönliche Mitteilung]. Während zuvor gezeigt wurde, dass die Aktivität von MAK-2 die Lokalisation von SO beeinflusst [Fleissner et al., 2009], deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass die Aktivität von MAK-2 auch für die eigene subzelluläre Dynamik während der Keimlingsinteraktion benötigt wird. Zum anderen deuten die Beobachtungen auch darauf hin, dass die Aktivität von MAK-2

keine Voraussetzung für die Lokalisation der MAP-Kinase am Berührungspunkt der Interaktionspartner ist. Gemeinsam könnten die diskutierten Daten ein Keimlings-Interaktions-Modell unterstützen, in dem die Aktivität von MAK-2 mit der subzellulären Lokalisation oszilliert, wobei die Kinase im Cytoplasma deaktiviert wird. Nach der Berührung der Interaktionspartner könnte MAK-2 in der Phase mit geringerem Aktivierungsstatus besonders zugänglich für eine schnelle Deaktivierung sein. Dies würde eine besonders schnelle Deaktivierung der MAK-2-Aktivität ermöglichen, was eine Voraussetzung für den Wachstumsstopp und die Lokalisation von SO an dem Berührungspunkt sein könnte. Gleichzeitig würde eine Akkumulation von putativ deaktiviertem MAK-2 am Berührungspunkt einen Erklärungsansatz dafür liefern, weshalb SO und MAK-2 an dieser Stelle co-lokalisieren.

Die Identifizierung von SO, den Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade und zahlreichen weiteren Faktoren, die zur Zell-Zell-Kommunikation und -Fusion von *N. crassa* beitragen, hat in den letzten 15 Jahren unser Verständnis für die molekularen Mechanismen dieser Vorgänge erweitert [Lichius and Lord, 2014]. Dennoch stehen wir erst am Anfang, das koordinierte Zusammenspiel dieser Faktoren zu verstehen, das zur Robustheit und Spezifität der Signaltransduktion und der Zellantwort beiträgt. Weitere interessante Fragen, deren Beantwortung in der Zukunft das Verständnis für die Zell-Zell-Kommunikation und -Fusion erweitern könnten, umfassen:

- Welches chemotrope Signal und welche Rezeptoren spielen bei der Ausrichtung des polaren Wachstums während der vegetativen Zellfusion in *N. crassa* eine Rolle?
- Welche Faktoren aktivieren die MAPKKK NRC-1 und lösen damit die Aktivierung des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls aus?
- Welche molekularen Mechanismen verbinden die Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade mit den Polaritätsfaktoren, die zu gerichtetem Wachstum führen?
- Welche weiteren Aufgaben erfüllen die Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls an der sich öffnenden Fusionspore?

4. Diskussion

- Welcher funktionelle Zusammenhang besteht zwischen den MAK-1 und MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskaden und dem Protein SO?

5. Zusammenfassung

Zellfusionen spielen eine bedeutende Rolle für die Entwicklung eukaryotischer Lebewesen [Willkomm and Bloch, 2015]. Der filamentöse Pilz *N. crassa* weist in seinem Lebenszyklus mindestens vier verschiedene Zellfusionsereignisse auf, die bei der Bildung typischer vernetzter Myzelien und während der sexuellen Reproduktion von Bedeutung sind. Auf Grund der einfachen Zugänglichkeit für genetische, biochemische, molekularbiologische, zellbiologische und bioinformatische Experimente hat *N. crassa* sich als beliebter Modellorganismus für die Erforschung von Zellfusionen etabliert. Eine zentrale Bedeutung hat hierbei die Untersuchung von Keimlingsfusionen eingenommen, in deren Verlauf genetisch potentiell identische Keimlinge über eine räumliche Distanz miteinander kommunizieren, gerichtet aufeinander zuwachsen und fusionieren [Fleissner et al., 2009; Herzog et al., 2015]. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der MAP-Kinase MAK-2 und SO, ein Protein mit unzureichend verstandenen molekularen Funktionen, zeigten eine ungewöhnliche subzelluläre Dynamik der beiden Proteine auf. Während des gerichteten Wachstums der Keimlinge lokalisieren SO und MAK-2 exakt gegenläufig oszillierend an den Spitzen beider Interaktionspartner. Basierend auf dieser Beobachtung wurde ein ungewöhnlicher Mechanismus der Zell-Zell-Kommunikation vorgeschlagen, in dem die interagierenden Keimlinge schnell zwischen zwei physiologischen Zuständen wechseln. In diesem als „Zelldialog“ bezeichnetem Modell werden die physiologischen Zustände durch die An- oder Abwesenheit von MAK-2 an der Spitze des Keimlings charakterisiert und mit dem Empfangen oder Senden eines unbekannten chemotropen Signals in Verbindung gebracht.

In dieser Arbeit wurde durch fluoreszenzmikroskopische *Live Cell Imaging*-Experimente gezeigt, dass MAK-2 gleichzeitig mit der aktivierenden MAPKK MEK-2 an den Spitzen interagierender Keimlinge oszilliert. Nachdem die Keimlinge physischen Kontakt hergestellt haben co-lokalisieren alle drei Kinasen des MAP-Kinasen-Moduls an dem Berührungspunkt. Um die Zusammenhänge zwischen der ungewöhnlichen subzellulären Lokalisation, der Funktion und der Aktivität von MAK-2 zu untersuchen, wurde die Kinase über einen Farnesylanker künstlich an die Plasmamembran rekrutiert und die Dynamik der Kinase hierdurch vollständig unterbro-

chen. Obwohl die artifizielle Membranrestriktion zu einer Hyperphosphorylierung der Kinase führt, die mit dem Aktivierungsstatus korreliert, ist die Dynamik der Kinase essentiell für ihre Funktion. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass die Aktivierung der MAP-Kinase an der Plasmamembran stattfindet, während die aktivierte Kinase in den Zellkern transloziert, um ihre Aufgaben zu erfüllen. Im Gegensatz dazu trägt die subzelluläre Dynamik der *Upstream*-Kinase MEK-2 zur Funktion der Kinase bei, ist aber nicht essentiell für vegetative Zellfusionen. Überraschenderweise führt eine Überexpression der membrangebundenen MEK-2-Kinasevariante zu einem starken Polaritätsdefekt in Keimlingen, der in reifen Hyphen nicht mehr vorhanden ist. Diese Beobachtung zeigt eine direkte Verbindung zwischen dem MAK-2 MAP-Kinasen-Modul und der Polaritätsmaschinerie auf, die für die Zellantwort des gerichteten Wachstums benötigt wird. Insgesamt hebt diese Arbeit den engen Zusammenhang zwischen der subzellulären Lokalisation, der Aktivität und der Funktion von Proteinen hervor, der in der Zukunft zu unserem Verständnis der intrazellulären Signaltransduktion und ihrer Bedeutung bei der Regulation von spezifischen Zellantworten beitragen kann.

Literaturverzeichnis

- Abmayr, S. M. and Pavlath, G. K. (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development (Cambridge, England)*, 139:641–656.
- Aguilar, P. S., Baylies, M. K., Fleissner, A., Helming, L., Inoue, N., Podbilewicz, B., Wang, H., and Wong, M. (2013). Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends in genetics : TIG*, 29:427–437.
- Aigouy, B. and Mirouse, V. (2013). ScientiFig: a tool to build publication-ready scientific figures. *Nature methods*, 10:1048.
- Albert, R. (2005). Scale-free networks in cell biology. *Journal of cell science*, 118:4947–4957.
- Aldabbous, M. S., Roca, M. G., Stout, A., Huang, I.-C., Read, N. D., and Free, S. J. (2010). The *ham-5*, *rcm-1* and *rco-1* genes regulate hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Microbiology (Reading, England)*, 156:2621–2629.
- Aldana, M. and Cluzel, P. (2003). A natural class of robust networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:8710–8714.
- Alvaro, C. G. and Thorner, J. (2016). Heterotrimeric G protein-coupled receptor signaling in yeast mating pheromone response. *The Journal of biological chemistry*, 291:7788–7795.
- Anderson, J. M., Rodriguez, A., and Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology*, 20:86–100.
- Andresen, M., Schmitz-Salue, R., and Jakobs, S. (2004). Short tetracysteine tags to beta-tubulin demonstrate the significance of small labels for live cell imaging. *Mol Biol Cell*, 15(12):5616–5622.
- Aramayo, R. and Metzenberg, R. L. (1996). Gene replacement at the *his-3* locus of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter*, 43:9–13.
- Araujo-Palomares, C. L., Castro-Longoria, E., and Riquelme, M. (2007). Ontogeny of the Spitzenkörper in germlings of *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 44:492–503.
- Atay, O. and Skotheim, J. M. (2017). Spatial and temporal signal processing and decision making by MAPK pathways. *The Journal of cell biology*.
- Ball, E. E. and Goodman, C. S. (1985). Muscle development in the grasshopper embryo. ii. syncytial origin of the extensor tibiae muscle pioneers. *Developmental biology*, 111:399–416.
- Barabási, A.-L. and Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature reviews. Genetics*, 5:101–113.
- Bardwell, L. (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides*, 26:339–350.
- Bastiaans, E., Debets, A. J. M., and Aanen, D. K. (2015). Experimental demonstration of the benefits of somatic fusion and the consequences for allorecognition. *Evolution; international journal of organic evolution*, 69:1091–1099.

- Beadle, G. W. and Tatum, E. L. (1941). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 27:499–506.
- Berepiki, A., Lichius, A., and Read, N. D. (2011). Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nature reviews. Microbiology*, 9:876–887.
- Berepiki, A., Lichius, A., Shoji, J.-Y., Tilsner, J., and Read, N. D. (2010). F-actin dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, 9(4):547–557.
- Bi, E. and Park, H.-O. (2012). Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics*, 191:347–387.
- Bistis, G. N., Perkins, D. D., and Read, N. N. (2003). Deifferent cell types in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletter*, 50:17–19.
- Blackwell, E., Kim, H.-J. N., and Stone, D. E. (2007). The pheromone-induced nuclear accumulation of the Fus3 MAPK in yeast depends on its phosphorylation state and on Dig1 and Dig2. *BMC cell biology*, 8:44.
- Bleichrodt, R.-J., van Veluw, G. J., Recter, B., Maruyama, J.-I., Kitamoto, K., and Wösten, H. A. B. (2012). Hyphal heterogeneity in *Aspergillus oryzae* is the result of dynamic closure of septa by woronin bodies. *Molecular microbiology*, 86:1334–1344.
- Blondel, M., Alepuz, P. M., Huang, L. S., Shaham, S., Ammerer, G., and Peter, M. (1999). Nuclear export of Far1p in response to pheromones requires the export receptor Msn5p/Ste21p. *Genes & development*, 13:2284–2300.
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F. E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J. E., Dunlap, J. C., Loros, J. J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E. U., Sachs, M. S., Marzluf, G. A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D. J., Zelter, A., Kalkman, E. R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., and Pratt, R. (2004). Lessons from the genome sequence of *neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 68:1–108.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72:248–254.
- Burkholder, A. C. and Hartwell, L. H. (1985). The yeast alpha-factor receptor: structural properties deduced from the sequence of the STE2 gene. *Nucleic acids research*, 13:8463–8475.
- Chapman, S. A. and Asthagiri, A. R. (2009). Quantitative effect of scaffold abundance on signal propagation. *Molecular systems biology*, 5:313.
- Chen, E. H., Grote, E., Mohler, W., and Vignery, A. (2007). Cell-cell fusion. *FEBS letters*, 581:2181–2193.
- Chen, R. E., Patterson, J. C., Goupil, L. S., and Thorner, J. (2010). Dynamic localization of Fus3 mitogen-activated protein kinase is necessary to evoke appropriate responses and avoid cytotoxic effects. *Molecular and cellular biology*, 30:4293–4307.
- Chen, R. E. and Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, 1773:1311–1340.

- Chinnici, J. L., Fu, C., Caccamise, L. M., Arnold, J. W., and Free, S. J. (2014). *Neurospora crassa* female development requires the PACC and other signal transduction pathways, transcription factors, chromatin remodeling, cell-to-cell fusion, and autophagy. *PloS one*, 9:e110603.
- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A., and Dunlap, J. C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:10352–10357.
- Crampin, H., Finley, K., Gerami-Nejad, M., Court, H., Gale, C., Berman, J., and Sudbery, P. (2005). *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *Journal of cell science*, 118:2935–2947.
- Davis, R. H. and Perkins, D. D. (2002). Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes. *Nature reviews. Genetics*, 3:397–403.
- Dementhon, K., Iyer, G., and Glass, N. L. (2006). VIB-1 is required for expression of genes necessary for programmed cell death in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, 5(12):2161–2173.
- Dettmann, A., Heilig, Y., Ludwig, S., Schmitt, K., Illgen, J., Fleißner, A., Valerius, O., and Seiler, S. (2013). HAM-2 and HAM-3 are central for the assembly of the *Neurospora* STRIPAK complex at the nuclear envelope and regulate nuclear accumulation of the MAP kinase MAK-1 in a MAK-2-dependent manner. *Mol Microbiol*, 90(4):796–812.
- Dettmann, A., Heilig, Y., Valerius, O., Ludwig, S., and Seiler, S. (2014). Fungal communication requires the MAK-2 pathway elements STE-20 and RAS-2, the NRC-1 adapter STE-50 and the MAP kinase scaffold HAM-5. *PLoS genetics*, 10:e1004762.
- Dettmann, A., Illgen, J., März, S., Schürg, T., Fleissner, A., and Seiler, S. (2012). The NDR kinase scaffold HYM1/MO25 is essential for MAK2 map kinase signaling in *Neurospora crassa*. *PLoS Genet*, 8(9):e1002950.
- Dowell, S. J., Bishop, A. L., Dyos, S. L., Brown, A. J., and Whiteway, M. S. (1998). Mapping of a yeast G protein betagamma signaling interaction. *Genetics*, 150:1407–1417.
- Dunlap, J. C., Borkovich, K. A., Henn, M. R., Turner, G. E., Sachs, M. S., Glass, N. L., McCluskey, K., Plamann, M., Galagan, J. E., Birren, B. W., Weiss, R. L., Townsend, J. P., Loros, J. J., Nelson, M. A., Lambreghts, R., Colot, H. V., Park, G., Collopy, P., Ringelberg, C., Crew, C., Litvinkova, L., DeCaprio, D., Hood, H. M., Curilla, S., Shi, M., Crawford, M., Koerhsen, M., Montgomery, P., Larson, L., Pearson, M., Kasuga, T., Tian, C., Baştürkmen, M., Altamirano, L., and Xu, J. (2007). Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project. *Advances in genetics*, 57:49–96.
- Elion, E. A. (2001). The Ste5p scaffold. *Journal of cell science*, 114:3967–3978.
- Errede, B. and Levin, D. E. (1993). A conserved kinase cascade for MAP kinase activation in yeast. *Current opinion in cell biology*, 5:254–260.
- Esch, R. K. and Errede, B. (2002). Pheromone induction promotes Ste11 degradation through a MAPK feedback and ubiquitin-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:9160–9165.

- Feng, Y., Song, L. Y., Kincaid, E., Mahanty, S. K., and Elion, E. A. (1998). Functional binding between Gbeta and the LIM domain of Ste5 is required to activate the MEKK Ste11. *Current biology : CB*, 8:267–278.
- Ferrell, J. E. (1996). Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends in biochemical sciences*, 21:460–466.
- Fischer-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A., and Read, N. D. (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc*, 198(Pt 3):246–259.
- Fleissner, A. and Glass, N. L. (2007). SO, a protein involved in hyphal fusion in *Neurospora crassa*, localizes to septal plugs. *Eukaryotic cell*, 6:84–94.
- Fleissner, A., Leeder, A. C., Roca, M. G., Read, N. D., and Glass, N. L. (2009). Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(46):19387–19392.
- Fleissner, A., Sarkar, S., Jacobson, D. J., Roca, M. G., Read, N. D., and Glass, N. L. (2005). The so locus is required for vegetative cell fusion and postfertilization events in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, 4:920–930.
- Fleissner, A. and Serrano, A. (2016). *The Mycota*, volume I, chapter The Art of Networking: Vegetative Hyphal Fusion in Filamentous Fungi, pages 133–153.
- Fleissner, A., Simonin, A. R., and Glass, N. L. (2008). Cell fusion in the filamentous fungus, *Neurospora crassa*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 475:21–38.
- Foster, L. J., De Hoog, C. L., and Mann, M. (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:5813–5818.
- Freitag, M., Hickey, P. C., Raju, N. B., Selker, E. U., and Read, N. D. (2004). GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 41:897–910.
- Fu, C., Iyer, P., Herkal, A., Abdullah, J., Stout, A., and Free, S. J. (2011). Identification and characterization of genes required for cell-to-cell fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, 10:1100–1109.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.-J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M. A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C. P., Kinsey, J. A., Braun, E. L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G. O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R. L., Perkins, D. D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catchside, D., Li, W., Pratt, R. J., Osmani, S. A., DeSouza, C. P. C., Glass, L., Orbach, M. J., Berglund, J. A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D. O., Alex, L. A., Mannhaupt, G., Ebbole, D. J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M. S., Lander, E. S., Nusbaum, C., and Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422:859–868.

- Gammie, A. E., Brizzio, V., and Rose, M. D. (1998). Distinct morphological phenotypes of cell fusion mutants. *Molecular biology of the cell*, 9:1395–1410.
- Gao, P. and Zheng, J. (2011). Oncogenic virus-mediated cell fusion: New insights into initiation and progression of oncogenic viruses-related cancers. *Cancer letters*, 303:1–8.
- Garrington, T. P. and Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current opinion in cell biology*, 11:211–218.
- Gartner, A., Nasmyth, K., and Ammerer, G. (1992). Signal transduction in *saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes & development*, 6:1280–1292.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425:737–741.
- Goebel, V. (2012). Einfluss der subzellulären Lokalisierung auf die Aktivität der MAP-Kinase MAK-2 in *Neurospora crassa*. Bachelors' thesis, TU Braunschweig.
- Goryachev, A. B., Lichius, A., Wright, G. D., and Read, N. D. (2012). Excitable behavior can explain the "ping-pong" mode of communication between cells using the same chemoattractant. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 34:259–266.
- Harrison, R. and DeLisi, C. (2002). Condition specific transcription factor binding site characterization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18:1289–1296.
- Hegemann, B., Unger, M., Lee, S. S., Stoffel-Studer, I., van den Heuvel, J., Pelet, S., Koeppl, H., and Peter, M. (2015). A cellular system for spatial signal decoding in chemical gradients. *Developmental cell*, 35:458–470.
- Heiman, M. G. and Walter, P. (2000). Prm1p, a pheromone-regulated multispinning membrane protein, facilitates plasma membrane fusion during yeast mating. *The Journal of cell biology*, 151:719–730.
- Herzog, S., Schumann, M. R., and Fleißner, A. (2015). Cell fusion in *Neurospora crassa*. *Current opinion in microbiology*, 28:53–59.
- Hickey, P. C., Jacobson, D., Read, N. D., and Glass, N. L. (2002). Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 37:109–119.
- Hilioti, Z., Sabbagh, W., Paliwal, S., Bergmann, A., Goncalves, M. D., Bardwell, L., and Levchenko, A. (2008). Oscillatory phosphorylation of yeast Fus3 MAP kinase controls periodic gene expression and morphogenesis. *Current biology : CB*, 18:1700–1706.
- Horowitz, N. H. (1991). Fifty years ago: the *Neurospora* revolution. *Genetics*, 127:631–635.
- Hung, W., Olson, K. A., Breitreutz, A., and Sadowski, I. (1997). Characterization of the basal and pheromone-stimulated phosphorylation states of Ste12p. *European journal of biochemistry*, 245:241–251.
- Hurst, J. H. and Dohlman, H. G. (2013). Dynamic ubiquitination of the mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) Ste7 determines mitogen-activated protein kinase (MAPK) specificity. *The Journal of biological chemistry*, 288:18660–18671.

- Ichii-ishi, A. and Inoue, H. (1995). Cloning, nucleotide sequence, and expression of tef-1, the gene encoding translation elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) of *Neurospora crassa*. *Jpn J Genet*, 70(2):273–287.
- Jenness, D. D., Burkholder, A. C., and Hartwell, L. H. (1983). Binding of alpha-factor pheromone to yeast cells: chemical and genetic evidence for an alpha-factor receptor. *Cell*, 35:521–529.
- Jeong, H., Tombor, B., Albert, R., Oltvai, Z. N., and Barabási, A. L. (2000). The large-scale organization of metabolic networks. *Nature*, 407:651–654.
- Jin, H., Carlile, C., Nolan, S., and Grote, E. (2004). Prm1 prevents contact-dependent lysis of yeast mating pairs. *Eukaryotic cell*, 3:1664–1673.
- Jonkers, W., Fischer, M. S., Do, H. P., Starr, T. L., and Glass, N. L. (2016). Chemotropism and cell fusion in *Neurospora crassa* relies on the formation of distinct protein complexes by HAM-5 and a novel protein HAM-14. *Genetics*, 203:319–334.
- Jonkers, W., Leeder, A. C., Ansong, C., Wang, Y., Yang, F., Starr, T. L., Camp, D. G., Smith, R. D., and Glass, N. L. (2014). HAM-5 functions as a MAP kinase scaffold during cell fusion in *Neurospora crassa*. *PLoS genetics*, 10:e1004783.
- Justa-Schuch, D., Heilig, Y., Richthammer, C., and Seiler, S. (2010). Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factors BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*. *Molecular microbiology*, 76:220–235.
- Kamei, M., Yamashita, K., Takahashi, M., Fukumori, F., Ichiiishi, A., and Fujimura, M. (2016). Involvement of MAK-1 and MAK-2 MAP kinases in cell wall integrity in *Neurospora crassa*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80:1843–1852.
- Khoury, G. A., Smadbeck, J., Kieslich, C. A., and Floudas, C. A. (2014). Protein folding and de novo protein design for biotechnological applications. *Trends Biotechnol*, 32(2):99–109.
- Kim, H. and Borkovich, K. A. (2004). A pheromone receptor gene, pre-1, is essential for mating type-specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. *Molecular microbiology*, 52:1781–1798.
- Kim, H. and Borkovich, K. A. (2006). Pheromones are essential for male fertility and sufficient to direct chemotropic polarized growth of trichogynes during mating in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, 5:544–554.
- Kim, H., Wright, S. J., Park, G., Ouyang, S., Krystofova, S., and Borkovich, K. A. (2012). Roles for receptors, pheromones, G proteins, and mating type genes during sexual reproduction in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 190:1389–1404.
- Knechtle, P., Wendland, J., and Philippsen, P. (2006). The SH3/PH domain protein AgBoi1/2 collaborates with the Rho-type GTPase AgRho3 to prevent nonpolar growth at hyphal tips of *Ashbya gossypii*. *Eukaryotic cell*, 5:1635–1647.
- Koehler, E. (1930). Zur kenntnis der vegetativen anastomosen der pilze, ii. *Planta*, 10.
- Kothe, G. O. and Free, S. J. (1998). The isolation and characterization of *nrc-1* and *nrc-2*, two genes encoding protein kinases that control growth and development in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 149(1):117–130.

- Kozubowski, L., Saito, K., Johnson, J. M., Howell, A. S., Zyla, T. R., and Lew, D. J. (2008). Symmetry-breaking polarization driven by a Cdc42p GEF-PAK complex. *Current biology : CB*, 18:1719–1726.
- Lamb, T. M., Vickery, J., and Bell-Pedersen, D. (2013). Regulation of gene expression in *Neurospora crassa* with a copper responsive promoter. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3:2273–2280.
- Lamson, R. E., Winters, M. J., and Pryciak, P. M. (2002). Cdc42 regulation of kinase activity and signaling by the yeast p21-activated kinase Ste20. *Molecular and cellular biology*, 22:2939–2951.
- Leeder, A. C., Jonkers, W., Li, J., and Glass, N. L. (2013). Early colony establishment in *Neurospora crassa* requires a MAP kinase regulatory network. *Genetics*, 195:883–898.
- Leeder, A. C., Palma-Guerrero, J., and Glass, N. L. (2011). The social network: deciphering fungal language. *Nat Rev Microbiol*, 9(6):440–451.
- Leeuw, T., Wu, C., Schrag, J. D., Whiteway, M., Thomas, D. Y., and Leberer, E. (1998). Interaction of a G-protein beta-subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature*, 391:191–195.
- Lemanski, J. (2010). Untersuchungen zur Rolle der subzellulären Lokalisation von SO und MAK-2 in der Zellfusion von *Neurospora crassa*. Master's thesis, Technische Universität Braunschweig.
- Letz, A. (2014). Zellfusion in *Neurospora crassa*: Die Rolle der subzellulären Lokalisierung des MAK-2 MAP-Kinase-Moduls. Master's thesis, Technische Universität Braunschweig.
- Li, D., Bobrowicz, P., Wilkinson, H. H., and Ebbole, D. J. (2005). A mitogen-activated protein kinase pathway essential for mating and contributing to vegetative growth in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 170:1091–1104.
- Lichius, A. (2010). *Cell Fusion in Neurospora crassa*. PhD thesis, The University of Edinburgh.
- Lichius, A. and Lord, K. M. (2014). Chemoattractive mechanisms in filamentous fungi. *The Open Mycology Journal*, 8:28–57.
- Lichius, A., Lord, K. M., Jeffree, C. E., Oborny, R., Boonyarungsrit, P., and Read, N. D. (2012a). Importance of MAP kinases during protoperithecial morphogenesis in *Neurospora crassa*. *PloS one*, 7:e42565.
- Lichius, A., Yáñez-Gutiérrez, M. E., Read, N. D., and Castro-Longoria, E. (2012b). Comparative live-cell imaging analyses of SPA-2, BUD-6 and BNI-1 in *Neurospora crassa* reveal novel features of the filamentous fungal polarisome. *PloS one*, 7:e30372.
- Lorang, J. M., Tuori, R. P., Martinez, J. P., Sawyer, T. L., Redman, R. S., Rollins, J. A., Wolpert, T. J., Johnson, K. B., Rodriguez, R. J., Dickman, M. B., and Ciuffetti, L. M. (2001). Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and environmental microbiology*, 67:1987–1994.
- Loros, J. J., Denome, S. A., and Dunlap, J. C. (1989). Molecular cloning of genes under control of the circadian clock in *Neurospora*. *Science*, 243(4889):385–388.
- Lunding, H. (2013). Regulation der MAP-Kinase MAK-2 in *Neurospora crassa*. Bachelors' thesis, TU Braunschweig.

- Lyons, D. M., Mahanty, S. K., Choi, K. Y., Manandhar, M., and Elion, E. A. (1996). The SH3-domain protein Bem1 coordinates mitogen-activated protein kinase cascade activation with cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 16:4095–4106.
- Maeder, C. I., Hink, M. A., Kinkhabwala, A., Mayr, R., Bastiaens, P. I. H., and Knop, M. (2007). Spatial regulation of Fus3 MAP kinase activity through a reaction-diffusion mechanism in yeast pheromone signalling. *Nature cell biology*, 9:1319–1326.
- Maerz, S., Dettmann, A., Ziv, C., Liu, Y., Valerius, O., Yarden, O., and Seiler, S. (2009). Two NDR kinase-MOB complexes function as distinct modules during septum formation and tip extension in *Neurospora crassa*. *Molecular microbiology*, 74:707–723.
- Maerz, S., Ziv, C., Vogt, N., Helmstaedt, K., Cohen, N., Gorovits, R., Yarden, O., and Seiler, S. (2008). The nuclear Dbf2-related kinase COT1 and the mitogen-activated protein kinases MAK1 and MAK2 genetically interact to regulate filamentous growth, hyphal fusion and sexual development in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 179:1313–1325.
- Manahan, C. L., Patnana, M., Blumer, K. J., and Linder, M. E. (2000). Dual lipid modification motifs in G(alpha) and G(gamma) subunits are required for full activity of the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 11:957–968.
- Marcus, S., Polverino, A., Barr, M., and Wigler, M. (1994). Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:7762–7766.
- Markham, P. (1994). Occlusions of septal pores in filamentous fungi. *Mycological Research*, 98(10):1089–1106.
- Markham, P. and Collinge, A. J. (1987). Woronin bodies of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 46:1–11.
- Maruyama, J.-i., Escaño, C. S., and Kitamoto, K. (2010). AoSO protein accumulates at the septal pore in response to various stresses in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 391:868–873.
- Matheos, D., Metodiev, M., Muller, E., Stone, D., and Rose, M. D. (2004). Pheromone-induced polarization is dependent on the Fus3p MAPK acting through the formin Bni1p. *The Journal of cell biology*, 165:99–109.
- Mattison, C. P., Spencer, S. S., Kresge, K. A., Lee, J., and Ota, I. M. (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Molecular and cellular biology*, 19:7651–7660.
- McCluskey, K. (2011). From genetics to genomic: fungal collections at the Fungal Genetics Stock Center. *Mycology*.
- McCluskey, K. and Wiest, A. (2011). The Fungal Genetics Stock Center in the context of a world wide community of *ex situ* fungal germplasm repositories. *Fungal Biology Reviews*, 25(3):143–150.
- McCluskey, K., Wiest, A., and Plamann, M. (2010). The Fungal Genetics Stock Center: a repository for 50 years of fungal genetics research. *Journal of biosciences*, 35:119–126.

- McCluskey, K., Wiest, A. E., Grigoriev, I. V., Lipzen, A., Martin, J., Schackwitz, W., and Baker, S. E. (2011). Rediscovery by whole genome sequencing: Classical mutations and genome polymorphisms in *Neurospora crassa*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 1:303–316.
- McNally, M. T. and Free, S. J. (1988). Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene. *Curr Genet*, 14(6):545–551.
- Merlini, L., Dudin, O., and Martin, S. G. (2013). Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open biology*, 3:130008.
- Moskow, J. J., Gladfelter, A. S., Lamson, R. E., Pryciak, P. M., and Lew, D. J. (2000). Role of Cdc42p in pheromone-stimulated signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 20:7559–7571.
- Nakabayashi, J. and Sasaki, A. (2005). Optimal phosphorylation step number of intracellular signal-transduction pathway. *Journal of theoretical biology*, 233:413–421.
- Nakayama, N., Miyajima, A., and Arai, K. (1985). Nucleotide sequences of STE2 and STE3, cell type-specific sterile genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 4:2643–2648.
- Nern, A. and Arkowitz, R. A. (1999). A Cdc24p-Far1p-Gbetagamma protein complex required for yeast orientation during mating. *The Journal of cell biology*, 144:1187–1202.
- Nomoto, S., Nakayama, N., Arai, K., and Matsumoto, K. (1990). Regulation of the yeast pheromone response pathway by G protein subunits. *The EMBO journal*, 9:691–696.
- Nowrousian, M., Würtz, C., Pöggeler, S., and Kück, U. (2004). Comparative sequence analysis of *Sordaria macrospora* and *Neurospora crassa* as a means to improve genome annotation. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 41:285–292.
- Oren-Suissa, M. and Podbilewicz, B. (2007). Cell fusion during development. *Trends in cell biology*, 17:537–546.
- Oren-Suissa, M. and Podbilewicz, B. (2010). Evolution of programmed cell fusion: common mechanisms and distinct functions. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 239:1515–1528.
- Ouyang, S., Beecher, C. N., Wang, K., Larive, C. K., and Borkovich, K. A. (2015). Metabolic impacts of using nitrogen and copper-regulated promoters to regulate gene expression in *Neurospora crassa*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 5:1899–1908.
- Palma-Guerrero, J., Hall, C. R., Kowbel, D., Welch, J., Taylor, J. W., Brem, R. B., and Glass, N. L. (2013). Genome wide association identifies novel loci involved in fungal communication. *PLoS genetics*, 9:e1003669.
- Pandey, A., Roca, M. G., Read, N. D., and Glass, N. L. (2004). Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, 3(2):348–358.
- Parris, G. E. (2015). *Intercellular Communication in Cancer*, chapter Cell-Cell Fusion, Chemotaxis and Metastasis, pages 227–254. Springer.

- Perkins, D. D. (1992). *Neurospora*: the organism behind the molecular revolution. *Genetics*, 130:687–701.
- Podbilewicz, B. and White, J. G. (1994). Cell fusions in the developing epithelial of *C. elegans*. *Developmental biology*, 161:408–424.
- Pryciak, P. M. and Huntress, F. A. (1998). Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbetagamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes & development*, 12:2684–2697.
- Punt, P. J., Dingemanse, M. A., Jacobs-Meijsing, B. J., Pouwels, P. H., and van den Hondel, C. A. (1988). Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 69(1):49–57.
- Qi, M. and Elion, E. A. (2005). MAP kinase pathways. *Journal of cell science*, 118:3569–3572.
- Raju, N. B. (1980). Meiosis and ascospore genesis in *Neurospora*. *European journal of cell biology*, 23:208–223.
- Rasmussen, C. G., Morgenstein, R. M., Peck, S., and Glass, N. L. (2008). Lack of the GTPase RHO-4 in *Neurospora crassa* causes a reduction in numbers and aberrant stabilization of microtubules at hyphal tips. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 45:1027–1039.
- Read, N. D., Fleißner, A., Roca, M., and Glass, N. (2010). Hyphal fusion. *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*, pages 260–273.
- Read, N. D., Goryachev, A. B., and Lichius, A. (2012). The mechanistic basis of self-fusion between conidial anastomosis tubes during fungal colony initiation. *Fungal Biology Reviews*, 26:1–11.
- Richard, F., Glass, N. L., and Pringle, A. (2012). Cooperation among germinating spores facilitates the growth of the fungus, *Neurospora crassa*. *Biology letters*, 8:419–422.
- Riquelme, M., Bredeweg, E. L., Callejas-Negrete, O., Roberson, R. W., Ludwig, S., Beltrán-Aguilar, A., Seiler, S., Novick, P., and Freitag, M. (2014). The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Molecular biology of the cell*, 25:1312–1326.
- Riquelme, M. and Martínez-Núñez, L. (2016). Hyphal ontogeny in *Neurospora crassa*: a model organism for all seasons. *F1000Research*, 5:2801.
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S. J., Fleissner, A., Freitag, M., Lew, R. R., Mouriño-Pérez, R., Plamann, M., Rasmussen, C., Richthammer, C., Roberson, R. W., Sanchez-Leon, E., Seiler, S., and Watters, M. K. (2011). Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha – a model cell for polarized growth. *Fungal biology*, 115:446–474.
- Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M. J., Stoughton, R., Meyer, M. R., Bennett, H. A., He, Y. D., Dai, H., Walker, W. L., Hughes, T. R., Tyers, M., Boone, C., and Friend, S. H. (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science (New York, N.Y.)*, 287:873–880.
- Roca, M. G., Arlt, J., Jeffree, C. E., and Read, N. D. (2005). Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, 4:911–919.

- Roca, M. G., Kuo, H.-C., Lichius, A., Freitag, M., and Read, N. D. (2010). Nuclear dynamics, mitosis, and the cytoskeleton during the early stages of colony initiation in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, 9:1171–1183.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74:5463–5467.
- Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D., and Schnabel, H. (1997). Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Developmental biology*, 184:234–265.
- Segall, J. E. (1993). Polarization of yeast cells in spatial gradients of alpha mating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:8332–8336.
- Seiler, S. and Justa-Schuch, D. (2010). Conserved components, but distinct mechanisms for the placement and assembly of the cell division machinery in unicellular and filamentous ascomycetes. *Molecular microbiology*, 78:1058–1076.
- Shear, C. L. and Dodge, B. O. (1927). Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia Sitophila* group. *Journal of Agricultural Research*, 34(22).
- Shestopalov, V. I. and Bassnett, S. (2000). Expression of autofluorescent proteins reveals a novel protein permeable pathway between cells in the lens core. *Journal of cell science*, 113 (Pt 11):1913–1921.
- Sheu, Y. J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C., and Snyder, M. (1998). Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Molecular and cellular biology*, 18:4053–4069.
- Shi, Y., Barton, K., De Maria, A., Petrash, J. M., Shiels, A., and Bassnett, S. (2009). The stratified syncytium of the vertebrate lens. *Journal of cell science*, 122:1607–1615.
- Simonin, A., Palma-Guerrero, J., Fricker, M., and Glass, N. L. (2012). Physiological significance of network organization in fungi. *Eukaryotic cell*, 11:1345–1352.
- Slaughter, B. D., Schwartz, J. W., and Li, R. (2007). Mapping dynamic protein interactions in MAP kinase signaling using live-cell fluorescence fluctuation spectroscopy and imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:20320–20325.
- Sánchez-León, E., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R. W., Bartnicki-Garcia, S., and Riquelme, M. (2011). Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryotic cell*, 10:683–695.
- Springer, M. L. and Yanofsky, C. (1989). A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes & development*, 3:559–571.
- Stephens, D. J. and Allan, V. J. (2003). Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science (New York, N.Y.)*, 300:82–86.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., and Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 100:64–119.

- Takaku, T., Ogura, K., Kumeta, H., Yoshida, N., and Inagaki, F. (2010). Solution structure of a novel Cdc42 binding module of Bem1 and its interaction with Ste20 and Cdc42. *The Journal of biological chemistry*, 285:19346–19353.
- Tedford, K., Kim, S., Sa, D., Stevens, K., and Tyers, M. (1997). Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates. *Current biology : CB*, 7:228–238.
- Teichert, I., Steffens, E. K., Schnaß, N., Fränzel, B., Krisp, C., Wolters, D. A., and Kück, U. (2014). PRO40 is a scaffold protein of the cell wall integrity pathway, linking the MAP kinase module to the upstream activator protein kinase C. *PLoS genetics*, 10:e1004582.
- Thieme, N. (2014). Der Einfluss der MAP-Kinase-Kinase MEK-2 auf Fusionsereignisse, Tropismen und die sexuelle Entwicklung von *N. crassa*. Master's thesis, TU Braunschweig.
- Thomson, T. M., Benjamin, K. R., Bush, A., Love, T., Pincus, D., Resnekov, O., Yu, R. C., Gordon, A., Colman-Lerner, A., Endy, D., and Brent, R. (2011). Scaffold number in yeast signaling system sets tradeoff between system output and dynamic range. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:20265–20270.
- Torralba, S., Raudaskoski, M., Pedregosa, A. M., and Laborda, F. (1998). Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading, England)*, 144 (Pt 1):45–53.
- Valtz, N., Peter, M., and Herskowitz, I. (1995). FAR1 is required for oriented polarization of yeast cells in response to mating pheromones. *The Journal of cell biology*, 131:863–873.
- van Drogen, F., Stucke, V. M., Jorritsma, G., and Peter, M. (2001). MAP kinase dynamics in response to pheromones in budding yeast. *Nat Cell Biol*, 3(12):1051–1059.
- Vogel, H. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora*. *Microbiol Genet Bull*, 13:42–46.
- Wang, G.-Y. and Keasling, J. D. (2002). Amplification of HMG-CoA reductase production enhances carotenoid accumulation in *Neurospora crassa*. *Metabolic engineering*, 4:193–201.
- Wang, Y. and Dohlman, H. G. (2002). Pheromone-dependent ubiquitination of the mitogen-activated protein kinase kinase Ste7. *The Journal of biological chemistry*, 277:15766–15772.
- Ward, H. (1888). A lily disease. *Annals of Botany*, II(VII):319–382.
- Weichert, M. (2016). *Zelluläres Allgemeingut mit spezifischer Wirkung: Definierte strukturelle Merkmale von Sterolen beeinflussen die Zell-Zell-Kommunikation und -Fusion in Neurospora crassa*. PhD thesis, Technische Universität Braunschweig.
- Weichert, M. and Fleißner, A. (2015). *Genetic transformation system in Fungi*, volume 2, chapter Anas-tomosis and Heterokaryon Formation, pages 3–21. Springer, Heidelberg.
- Weichert, M., Lichius, A., Priegnitz, B.-E., Brandt, U., Gottschalk, J., Nawrath, T., Groenhagen, U., Read, N. D., Schulz, S., and Fleißner, A. (2016). Accumulation of specific sterol precursors targets a MAP kinase cascade mediating cell-cell recognition and fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Wickerham, L. J. (1958). Sexual agglutination of heterothallic yeasts in diverse taxonomic areas. *Science (New York, N.Y.)*, 128:1504–1505.

- Wiest, A., Baker, S. E., and McCluskey, K. (2013). *Neurospora: Genomics and Molecular Biology*, chapter *Neurospora Gene and Genome Analysis: Past Through Future*, pages 273–290. Caister Academic Press.
- Willkomm, L. and Bloch, W. (2015). State of the art in cell-cell fusion. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1313:1–19.
- Wright, L. P. and Philips, M. R. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res*, 47(5):883–891.
- Ydenberg, C. A. and Rose, M. D. (2008). Yeast mating: a model system for studying cell and nuclear fusion. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 475:3–20.
- Yeung, Y.-G. and Stanley, E. R. (2009). A solution for stripping antibodies from polyvinylidene fluoride immunoblots for multiple reprobing. *Analytical biochemistry*, 389:89–91.
- Youk, H. and Lim, W. A. (2014). Secreting and sensing the same molecule allows cells to achieve versatile social behaviors. *Science (New York, N.Y.)*, 343:1242782.
- Zhao, H., Shen, Z. M., Kahn, P. C., and Lipke, P. N. (2001). Interaction of alpha-agglutinin and a-agglutinin, *Saccharomyces cerevisiae* sexual cell adhesion molecules. *Journal of bacteriology*, 183:2874–2880.

A. Anhang

A.1. Messwerte und statistische Auswertung

A.1.1. MT-21-643 und MT-22-640

T-Test MT-21-643 und MT-22-640 Längenwachstum

```
> d <- read.table(file="data_MT-21_22_all.txt", sep="\t", dec=".", header=TRUE)
```

> Messwerte

	N1.01	KO.0142	MT.21.643	MT.38.404	MT.22.640	MT.39.381
1	68.16667	21.6	28.2	68.0	31.0	65.60
2	60.66667	23.2	28.6	71.6	32.0	71.40
3	65.50000	24.0	25.6	70.4	34.8	68.40
4	67.83333	22.0	30.4	67.4	36.6	74.75
5	66.66667	21.6	26.6	69.4	37.0	68.20
6	NA	23.8	29.6	NA	30.2	78.25

```
> t.test(d["N1.01"], d["KO.0142"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["KO.0142"]
t = 30.093, df = 4.8765, p-value = 9.975e-07          #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 39.35966 46.77368
sample estimates:
mean of x mean of y
 65.76667  22.70000
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.21.643"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.21.643"]
t = 24.329, df = 6.2634, p-value = 1.938e-07          #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 33.85653 41.34347
sample estimates:
mean of x mean of y
 65.76667  28.16667
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.38.404"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.38.404"]
t = -2.3024, df = 6.3185, p-value = 0.05874
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -7.3659901  0.1793235
sample estimates:
mean of x mean of y
 65.76667  69.36000
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.22.640"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.22.640"]
t = 17.773, df = 8.5105, p-value = 5.021e-08          #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 28.03639 36.29694
sample estimates:
mean of x mean of y
 65.76667  33.60000
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.39.381"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.39.381"]
t = -2.2682, df = 8.5756, p-value = 0.0509
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -10.69290482  0.02623816
sample estimates:
mean of x mean of y
 65.76667  71.10000
```

```

> t.test(d["KO.0142"],d["MT.21.643"])

welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.21.643"]
t = -6.3359, df = 8.2704, p-value = 0.0001945          #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -7.445049 -3.488284
sample estimates:
mean of x mean of y
 22.70000  28.16667

> t.test(d["KO.0142"],d["MT.22.640"])

welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.22.640"]
t = -8.534, df = 6.3856, p-value = 0.0001011          #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -13.980106 -7.819894
sample estimates:
mean of x mean of y
 22.7      33.6

> t.test(d["MT.21.643"],d["MT.22.640"])

welch Two Sample t-test

data: d["MT.21.643"] and d["MT.22.640"]
t = -3.8693, df = 8.3173, p-value = 0.004406          #hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -8.650047 -2.216619
sample estimates:
mean of x mean of y
 28.16667  33.60000

```

Lufthyphenbildung MT-21-643 und MT-22-640

```

> d <- read.table(file="data_Lufthyphen.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)

> Messwerte
      N1.01 KO.0142 MT.21.643 MT.38.404 MT.22.640 MT.39.381
1 17.00000 3.000000 5.666667 18.33333 5.666667 20.00000
2 17.66667 5.000000 5.333333 19.66667 5.666667 19.00000
3 17.00000 3.666667 4.333333 17.33333 4.333333 22.00000
4 16.33333 4.333333 5.333333 17.66667 4.000000 19.33333
5 20.00000 3.000000 3.333333 21.66667 5.000000 22.33333

```

WT mit Teststämmen vergleichen

```

> t.test(d["N1.01"],d["KO.0142"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["KO.0142"]
t = 18.515, df = 6.6229, p-value = 5.957e-07          #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 12.01696 15.58304
sample estimates:
mean of x mean of y
 17.6      3.8

> t.test(d["N1.01"],d["MT.21.643"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.21.643"]
t = 16.68, df = 7.0202, p-value = 6.611e-07          #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 10.98647 14.61353
sample estimates:
mean of x mean of y
 17.6      4.8

```

```

> t.test(d["N1.01"],d["MT.38.404"])

      Welch Two Sample t-test

data:  d["N1.01"] and d["MT.38.404"]
t = -1.3131, df = 7.6449, p-value = 0.2272
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -3.694001  1.027334
sample estimates:
mean of x mean of y
 17.60000  18.93333

> t.test(d["N1.01"],d["MT.22.640"])

      Welch Two Sample t-test

data:  d["N1.01"] and d["MT.22.640"]
t = 17.566, df = 6.1132, p-value = 1.831e-06      #höchst Signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 10.91006 14.42327
sample estimates:
mean of x mean of y
17.600000  4.933333

> t.test(d["N1.01"],d["MT.39.381"])

      Welch Two Sample t-test

data:  d["N1.01"] and d["MT.39.381"]
t = -1.3262, df = 6.6813, p-value = 0.2283
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -4.480658  1.280658
sample estimates:
mean of x mean of y
 17.6      19.2

Amak-2 mit Teststämmen vergleichen

> t.test(d["KO.0142"],d["N1.01"])

      Welch Two Sample t-test

data:  d["KO.0142"] and d["N1.01"]
t = -18.515, df = 6.6229, p-value = 5.957e-07      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -15.58304 -12.01696
sample estimates:
mean of x mean of y
 3.8      17.6

> t.test(d["KO.0142"],d["MT.21.643"])

      Welch Two Sample t-test

data:  d["KO.0142"] and d["MT.21.643"]
t = -1.7263, df = 7.9218, p-value = 0.1229
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -2.3381006  0.3381006
sample estimates:
mean of x mean of y
 3.8      4.8

> t.test(d["KO.0142"],d["MT.38.404"])

      Welch Two Sample t-test

data:  d["KO.0142"] and d["MT.38.404"]
t = -17.16, df = 5.8231, p-value = 3.299e-06      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -17.30730 -12.95937
sample estimates:
mean of x mean of y
 3.80000  18.93333

```

```
> t.test(d["KO.0142"],d["MT.22.640"])

welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.22.640"]
t = -2.1947, df = 7.8603, p-value = 0.06007
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -2.3278438  0.0611771
sample estimates:
mean of x mean of y
 3.800000  4.933333

> t.test(d["KO.0142"],d["MT.39.381"])

welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.39.381"]
t = -14.045, df = 5.1268, p-value = 2.741e-05 # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -18.1977 -12.6023
sample estimates:
mean of x mean of y
   3.8      19.2
```

Sporenbildung MT-21-643 und MT-22-640

[Workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/Sporenbildung_MT-21_22/.RData]

```
> d <- read.table(file="data_Sporenbildung.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)
> Messdaten
      N1.01 KO.0142 MT.21.643 MT.38.404 MT.22.640 MT.39.381
1 30.13950 2.204300 2.255250 21.88150  1.91675 25.92500
2 32.55788 2.846875 2.298900 29.76325  2.38235 26.96100
3 30.80600 2.559050 2.928125 26.67938  2.85175 23.47437
4 21.47250 2.751000 2.464500 26.07812  2.08910 25.15350
5 24.44200 2.525400 2.975062 26.31900  2.06000 25.27625
```

WT mit Teststämmen vergleichen

```
> t.test(d["N1.01"],d["KO.0142"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["KO.0142"]
t = 12.019, df = 4.0222, p-value = 0.0002662 #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 194.7288 311.3962
sample estimates:
mean of x mean of y
278.83575  25.77325

> t.test(d["N1.01"],d["MT.21.643"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.21.643"]
t = 12, df = 4.043, p-value = 0.0002601 #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 194.7003 311.2838
sample estimates:
mean of x mean of y
278.83575  25.84368

> t.test(d["N1.01"],d["MT.38.404"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.38.404"]
t = 0.71003, df = 6.5345, p-value = 0.5022
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -41.3786  76.1651
sample estimates:
mean of x mean of y
278.8358 261.4425
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.22.640"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.22.640"]
t = 12.148, df = 4.05, p-value = 0.0002453      #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 197.9579 314.5138
sample estimates:
mean of x mean of y
278.8358 22.5999
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.39.381"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.39.381"]
t = 1.1593, df = 4.5838, p-value = 0.3031
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -32.30773 82.81873
sample estimates:
mean of x mean of y
278.8358 253.5803
```

Δ mak-2 mit Teststämmen vergleichen

```
> t.test(d["KO.0142"],d["N1.01"])

Welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["N1.01"]
t = -12.019, df = 4.0222, p-value = 0.0002662      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -311.3962 -194.7288
sample estimates:
mean of x mean of y
25.77325 278.83575
```

```
> t.test(d["KO.0142"],d["MT.21.643"])

Welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.21.643"]
t = -0.037118, df = 7.2593, p-value = 0.9714
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -4.524668 4.383818
sample estimates:
mean of x mean of y
25.77325 25.84368
```

```
> t.test(d["KO.0142"],d["MT.38.404"])

Welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.38.404"]
t = -18.68, df = 4.062, p-value = 4.311e-05      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -270.4879 -200.8506
sample estimates:
mean of x mean of y
25.77325 261.44250
```

```
> t.test(d["KO.0142"],d["MT.22.640"])

Welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.22.640"]
t = 1.5895, df = 6.9658, p-value = 0.1562
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -1.552214 7.898914
sample estimates:
mean of x mean of y
25.77325 22.59990
```

```
> t.test(d["KO.0142"],d["MT.39.381"])

Welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.39.381"]
t = -39.264, df = 4.3017, p-value = 1.159e-06      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -243.480 -212.134
sample estimates:
mean of x mean of y
 25.77325 253.58025
```

T-Test abhängige Stichproben Keimlingsinteraktionen nach 4 und 6h MT-21-643 und MT-22-640

Output Keimlingsinteraktionen MT-21 und MT-22 Unterschiede von 4h (.1) zu 6h (.2)

[Workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/Keimlingsinteraktionen_MT-21_22/.RData]

```
> wt1 = c(96.4, 100, 96.2, 97.1, 90.7)
> wt1
[1] 96.4 100.0 96.2 97.1 90.7
> wt2 = c(94.2, 98.5, 100, 98.2, 100)
> wt2
[1] 94.2 98.5 100.0 98.2 100.0
> Dmak2.1 = c(0,0,0,3.42,5.66)
> Dmak2.1
[1] 0.00 0.00 0.00 3.42 5.66
> Dmak2.2 = c(1.83,0,0,4.75,4.92)
> MT.21.1=c(0,0,0,0,1.83)
> MT.21.1
[1] 0.00 0.00 0.00 0.00 1.83
> MT.21.2=c(0,0,0,1.83,0)
> MT.21.2
[1] 0.00 0.00 0.00 1.83 0.00
> MT.38.1=c(72.5,78.6,79.4,72.5,70.8)
> MT.38.1
[1] 72.5 78.6 79.4 72.5 70.8
> MT.38.2=c(76.1, 85.7,86.9,47.1,61.8)
> MT.38.2
[1] 76.1 85.7 86.9 47.1 61.8
> MT.22.1=c(0,1.89,0,1.82,1.96)
> MT.22.1
[1] 0.00 1.89 0.00 1.82 1.96
> MT.22.2=c(0,1.87,1.98,4.88,0)
> MT.22.2
[1] 0.00 1.87 1.98 4.88 0.00
> MT.39.1=c(85.4,84.8,77.1,85.8,80.9)
> MT.39.1
[1] 85.4 84.8 77.1 85.8 80.9
> MT.39.2=c(87.1,91.8,95.3,98.3,98.2)
> MT.39.2
[1] 87.1 91.8 95.3 98.3 98.2
> t.test(wt1,wt2,paired=TRUE)

Paired t-test

data: wt1 and wt2
t = -1.0058, df = 4, p-value = 0.3714
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -7.896723  3.696723
sample estimates:
mean of the differences
      -2.1

> t.test(Dmak2.1,Dmak2.2, paired = TRUE)

Paired t-test

data: Dmak2.1 and Dmak2.2
t = -1.021, df = 4, p-value = 0.365
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -1.8001228  0.8321228
sample estimates:
mean of the differences
      -0.484
```



```

> t.test(MT.21.1,MT.21.2, paired = TRUE)

    Paired t-test

data:  MT.21.1 and MT.21.2
t = 0, df = 4, p-value = 1
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -1.60672  1.60672
sample estimates:
mean of the differences
0

> t.test(MT.38.1,MT.38.2, paired = TRUE)

    Paired t-test

data:  MT.38.1 and MT.38.2
t = 0.51445, df = 4, p-value = 0.6341
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -14.24601  20.72601
sample estimates:
mean of the differences
3.24

> t.test(MT.22.1,MT.22.2, paired = TRUE)

    Paired t-test

data:  MT.22.1 and MT.22.2
t = -0.70079, df = 4, p-value = 0.5221
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -3.036687  1.812687
sample estimates:
mean of the differences
-0.612

> t.test(MT.39.1,MT.39.2, paired = TRUE)

    Paired t-test

data:  MT.39.1 and MT.39.2
t = -3.6253, df = 4, p-value = 0.02225          # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -20.024816  -2.655184
sample estimates:
mean of the differences
-11.34

```

Keimlingsinteraktionen MT-21-643 und MT-22-640 nach 4h

```

> d <- read.table(file="data_4h.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)
> Messdaten
      N1.01  KO.0142  MT.21.643  MT.38.404  MT.22.640  MT.39.381
1  96.36364  0.000000  0.000000  72.54902  0.000000  85.36585
2  100.00000  0.000000  0.000000  78.63248  1.886792  84.76190
3  96.15385  0.000000  0.000000  79.41176  0.000000  77.14286
4  97.12230  3.418803  0.000000  72.54902  1.818182  85.84906
5  90.69767  5.660377  1.834862  70.75472  1.960784  80.86957

```

WT mit Teststämmen vergleichen

```

> t.test(d["N1.01"],d["KO.0142"])

    Welch Two Sample t-test

data:  d["N1.01"] and d["KO.0142"]
t = 49.419, df = 7.5256, p-value = 9.897e-11      #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 89.80489 98.69842
sample estimates:
mean of x mean of y
96.067492  1.815836

```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.21.643"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.21.643"]
t = 61.646, df = 4.4718, p-value = 1.004e-07      #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 91.56385 99.83719
sample estimates:
mean of x mean of y
96.0674918  0.3669725

> t.test(d["N1.01"],d["MT.38.404"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.38.404"]
t = 9.1626, df = 7.8077, p-value = 1.903e-05      #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 15.90736 26.66882
sample estimates:
mean of x mean of y
96.06749  74.77940

> t.test(d["N1.01"],d["MT.22.640"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.22.640"]
t = 60.164, df = 4.7476, p-value = 4.99e-08      #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 90.81239 99.05629
sample estimates:
mean of x mean of y
96.067492  1.133152

> t.test(d["N1.01"],d["MT.39.381"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.39.381"]
t = 5.9059, df = 7.923, p-value = 0.0003729      #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
  8.079627 18.459662
sample estimates:
mean of x mean of y
96.06749  82.79785
```

Δmak-2 mit Teststämmen vergleichen

```
> t.test(d["KO.0142"],d["N1.01"])

welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["N1.01"]      #höchst signifikant
t = -49.419, df = 7.5256, p-value = 9.897e-11
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -98.69842 -89.80489
sample estimates:
mean of x mean of y
1.815836 96.067492

> t.test(d["KO.0142"],d["MT.21.643"])

welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.21.643"]
t = 1.1843, df = 4.7833, p-value = 0.2918
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -1.739380  4.637107
sample estimates:
mean of x mean of y
1.8158362 0.3669725
```

```
> t.test(d["KO.0142"],d["MT.38.404"])

Welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.38.404"]
t = -34.454, df = 6.9318, p-value = 5.207e-09      #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -77.98116 -67.94596
sample estimates:
mean of x mean of y
 1.815836 74.779400

> t.test(d["KO.0142"],d["MT.22.640"])

Welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.22.640"]
t = 0.5437, df = 5.2294, p-value = 0.609
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -2.502883  3.868251
sample estimates:
mean of x mean of y
 1.815836  1.133152

> t.test(d["KO.0142"],d["MT.39.381"])

Welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.39.381"]
t = -39.824, df = 7.1658, p-value = 1.124e-09      #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -85.76797 -76.19605
sample estimates:
mean of x mean of y
 1.815836 82.797847
```

Keimlingsinteraktionen MT-21-643 und MT-22-640 nach 6h

```
> d <- read.table(file="data_6h.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)
> Messdaten
      N1.01  KO.0142 MT.21.643 MT.38.404 MT.22.640 MT.39.381
1  94.23077 1.834862 0.000000 76.10619 0.000000 87.06897
2  98.47328 0.000000 0.000000 85.71429 1.869159 91.80328
3 100.00000 0.000000 0.000000 86.91589 1.980198 95.27559
4  98.21429 4.761905 1.834862 47.05882 4.878049 98.33333
5 100.00000 4.918033 0.000000 61.76471 0.000000 98.19820
```

WT mit Teststämmen vergleichen

```
> t.test(d["N1.01"],d["KO.0142"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["KO.0142"]
t = 63.208, df = 7.9926, p-value = 4.451e-12      #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 92.38216 99.37925
sample estimates:
mean of x mean of y
 98.18367  2.30296

> t.test(d["N1.01"],d["MT.21.643"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.21.643"]
t = 87.487, df = 4.952, p-value = 4.325e-09      #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 94.9342 100.6992
sample estimates:
mean of x mean of y
 98.1836675 0.3669725
```

```

> t.test(d["N1.01"],d["MT.38.404"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.38.404"]
t = 3.4792, df = 4.1547, p-value = 0.02386      #signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 5.696291 47.647085
sample estimates:
mean of x mean of y
98.18367 71.51198

> t.test(d["N1.01"],d["MT.22.640"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.22.640"]
t = 69.703, df = 7.787, p-value = 3.606e-12    #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
93.23242 99.64395
sample estimates:
mean of x mean of y
98.18367 1.745481

> t.test(d["N1.01"],d["MT.39.381"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.39.381"]
t = 1.7021, df = 5.8536, p-value = 0.1409
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-1.806766 9.902354
sample estimates:
mean of x mean of y
98.18367 94.13587

Δmak-2 mit Teststämmen vergleichen

> t.test(d["KO.0142"],d["N1.01"])

welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["N1.01"]
t = -63.208, df = 7.9926, p-value = 4.451e-12 #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-99.37925 -92.38216
sample estimates:
mean of x mean of y
2.30296 98.18367

> t.test(d["KO.0142"],d["MT.21.643"])

welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.21.643"]
t = 1.6849, df = 4.8971, p-value = 0.1541
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-1.036409 4.908384
sample estimates:
mean of x mean of y
2.3029600 0.3669725

> t.test(d["KO.0142"],d["MT.38.404"])

welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.38.404"]
t = -9.0226, df = 4.1644, p-value = 0.000692 #höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-90.17850 -48.23954
sample estimates:
mean of x mean of y
2.30296 71.51198

```

```
> t.test(d["KO.0142"],d["MT.22.640"])

welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.22.640"]
t = 0.39574, df = 7.7073, p-value = 0.703
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -2.712567  3.827525
sample estimates:
mean of x mean of y
 2.302960  1.745481

> t.test(d["KO.0142"],d["MT.39.381"])

welch Two Sample t-test

data: d["KO.0142"] and d["MT.39.381"]           #höchst signifikant
t = -38.378, df = 5.9557, p-value = 2.318e-08
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -97.69856 -85.96727
sample estimates:
mean of x mean of y
 2.30296  94.13587
```

A.1.2. MT-17-353 und MT-19-378

T-Test MT-17-353 und MT-19-378 Längenwachstum

```
> d <- read.table(file="data_MT-17_19_all.txt", sep="\t", dec=".", header=TRUE)
```

> Messwerte

```
  N1.01 MT.17.353 MT.27.358 MT.19.378 MT.49.361
1  61.00    46.50    61.75    47.25    61.50
2  67.25    60.25    64.50    46.75    59.50
3  54.25    55.25    59.00    42.00    58.00
4  56.50    53.00    59.00    45.50    60.75
5  60.75    55.50    58.75    45.00    74.00
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.17.353"])
```

```
Welch Two Sample t-test
```

```
data: d["N1.01"] and d["MT.17.353"]
t = 1.8522, df = 7.9999, p-value = 0.1011
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -1.433118 13.133118
sample estimates:
mean of x mean of y
  59.95    54.10
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.27.358"])
```

```
Welch Two Sample t-test
```

```
data: d["N1.01"] and d["MT.27.358"]
t = -0.26052, df = 5.8969, p-value = 0.8033
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -6.780988  5.480988
sample estimates:
mean of x mean of y
  59.95    60.60
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.19.378"])
```

```
Welch Two Sample t-test
```

```
data: d["N1.01"] and d["MT.19.378"]
t = 6.0739, df = 5.3235, p-value = 0.001399 #hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
  8.561508 20.738492
sample estimates:
mean of x mean of y
  59.95    45.30
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.49.361"])
```

```
Welch Two Sample t-test
```

```
data: d["N1.01"] and d["MT.49.361"]
t = -0.76969, df = 7.534, p-value = 0.4649
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -11.280013  5.680013
sample estimates:
mean of x mean of y
  59.95    62.75
```

T-Test abhängige Stichproben Keimlingsinteraktionen nach 4 und 6h MT-17-353 und MT-19-378 (wt 4 experiments only)

Output Keimlingsinteraktionen MT-17 und MT-19 Unterschiede von 4h (.1) zu 6h (.2)
[workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/Keimlingsinteraktionen_MT-17_19/.RData]

```
> wt1 = c(95.7,90.8,91.7,95.5)
> wt1
[1] 95.7 90.8 91.7 95.5
> wt2 = c(90.7,92.4,89.6,88)
> wt2
[1] 90.7 92.4 89.6 88.0
> MT.17.1=c(96.2,89.3,80.5,91.7,88.6)
> MT.17.1
[1] 96.2 89.3 80.5 91.7 88.6
> MT.17.2=c(98.4,98.2,74.4,94.4,98.4)
> MT.17.2
[1] 98.4 98.2 74.4 94.4 98.4
> MT.27.1=c(91.4,89.6,84.4,88.7,53)
> MT.27.1
[1] 91.4 89.6 84.4 88.7 53.0
> MT.27.2=c(90.6,96.4,93.2,92.7,98.3)
> MT.27.2
[1] 90.6 96.4 93.2 92.7 98.3
> MT.19.1=c(62.8,73.2,66.4,84.5,67.3)
> MT.19.1
[1] 62.8 73.2 66.4 84.5 67.3
> MT.19.2=c(82.4,65.5,66.1,71.7,68.8)
> MT.19.2
[1] 82.4 65.5 66.1 71.7 68.8
> MT.49.1=c(89,89.9,87.9,78.4,75.4)
> MT.49.1
[1] 89.0 89.9 87.9 78.4 75.4
> MT.49.2=c(93.4,96.3,86.4,94.4,83.8)
> MT.49.2
[1] 93.4 96.3 86.4 94.4 83.8
> t.test(wt1,wt2,paired=TRUE)
```

Paired t-test

```
data: wt1 and wt2
t = 1.6605, df = 3, p-value = 0.1954
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-2.978848  9.478848
sample estimates:
mean of the differences
3.25
```

```
> t.test(MT.17.1,MT.17.2, paired = TRUE)
```

Paired t-test

```
data: MT.17.1 and MT.17.2
t = -1.2247, df = 4, p-value = 0.2879
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-11.434515  4.434515
sample estimates:
mean of the differences
-3.5
```

```
> t.test(MT.27.1,MT.27.2, paired = TRUE)
```

Paired t-test

```
data: MT.27.1 and MT.27.2
t = -1.5486, df = 4, p-value = 0.1964
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-35.80461  10.16461
sample estimates:
mean of the differences
-12.82
```

```
> t.test(MT.19.1,MT.19.2, paired = TRUE)

Paired t-test

data: MT.19.1 and MT.19.2
t = -0.010868, df = 4, p-value = 0.9918
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-15.38854 15.26854
sample estimates:
mean of the differences
-0.06

> t.test(MT.49.1,MT.49.2, paired = TRUE)

Paired t-test

data: MT.49.1 and MT.49.2
t = -2.3683, df = 4, p-value = 0.07697
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-14.641706 1.161706
sample estimates:
mean of the differences
-6.74
```

Keimlingsinteraktionen MT-17-353 und MT-19-378 nach 4h (wt nur 4 Experimente)

[Workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/Keimlingsinteraktionen_MT-17_19/.RData]

```
> d <- read.table(file="d_Keimlingsinteraktionen_4h.txt", sep="\t", dec=".", header=TRUE)
> Messdaten
      N1.01      MT.17      MT.27      MT.19      MT.49
1 95.65217 96.15385 91.40625 62.77372 88.98305
2      NA 89.28571 89.56522 73.15436 89.91597
3 90.82569 80.53097 84.37500 66.38655 87.93103
4 91.74312 91.66667 88.67925 84.48276 78.37838
5 95.49550 88.59060 53.04348 67.27273 75.40984
> t.test(d["N1.01"],d["MT.17"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.17"]
t = 1.4729, df = 5.7205, p-value = 0.1936
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-2.849588 11.216704
sample estimates:
mean of x mean of y
93.42912 89.24556

> t.test(d["N1.01"],d["MT.27"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.27"]
t = 1.6472, df = 4.2416, p-value = 0.1708
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-7.789772 31.820334
sample estimates:
mean of x mean of y
93.42912 81.41384

> t.test(d["N1.01"],d["MT.19"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.19"]
t = 5.6495, df = 4.8396, p-value = 0.002679      #hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
12.22151 33.00867
sample estimates:
mean of x mean of y
93.42912 70.81403
```



```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.49"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.49"]
t = 2.8582, df = 5.2978, p-value = 0.03321      #signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 1.076062 17.534870
sample estimates:
mean of x mean of y
 93.42912  84.12365
```

Keimlingsinteraktionen MT-17-353 und MT-19-378 nach 6h (wt nur 4 Experimente)

```
[workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/Keimlingsinteraktionen_MT-17_19/.RData]
> d <- read.table(file="d_Keimlingsinteraktionen_6h.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)
```

> Messdaten

```
      N1.01   MT.17   MT.27   MT.19   MT.49
1 90.74074 98.38710 90.59829 82.44275 93.44262
2 92.42424 98.21429 96.36364 65.45455 96.26168
3 89.56522 74.24242 93.22034 66.12903 86.36364
4 88.03419 94.39252 92.72727 71.72414 94.44444
5      NA 98.41270 98.33333 68.75000 83.84615
> t.test(d["N1.01"],d["MT.17"])
```

```
Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.17"]
t = -0.53159, df = 4.3112, p-value = 0.6212
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-15.42915  10.35174
sample estimates:
mean of x mean of y
 90.19110  92.72981
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.27"])
```

```
Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.27"]
t = -2.445, df = 6.6361, p-value = 0.04629      #signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-8.02553972 -0.08941478
sample estimates:
mean of x mean of y
 90.19110  94.24857
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.19"])
```

```
Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.19"]
t = 5.9794, df = 4.703, p-value = 0.00231      #hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 10.83766 27.74435
sample estimates:
mean of x mean of y
 90.19110  70.90009
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.49"])
```

```
Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.49"]
t = -0.26165, df = 5.1068, p-value = 0.8038
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-7.325465  5.964243
sample estimates:
mean of x mean of y
 90.19110  90.87171
```

Zell-Zell-Kontakte MT-17-353 und MT-19-378 nach 4h

```
> d <- read.table(file="d_normal245_4h_v2.txt", sep="\t", dec=".", header=TRUE)

> Messdaten
      N1.01      MT.17      MT.27      MT.19      MT.49
1 98.18182 100.00000 98.29060 95.34884 99.04762
2 92.38095 95.00000 99.02913 71.55963 94.39252
3 96.96970 90.10989 94.44444 69.62025 94.11765
4 96.00000 97.27273 95.74468 69.38776 97.70115
5 96.22642 93.93939 81.96721 86.48649 97.82609

> t.test(d["N1.01"], d["MT.17"])

      welch Two Sample t-test

data:  d["N1.01"] and d["MT.17"]
t = 0.3581, df = 6.4575, p-value = 0.7317
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -3.930038  5.304786
sample estimates:
mean of x mean of y
95.95178  95.26440

> t.test(d["N1.01"], d["MT.27"])

      welch Two Sample t-test

data:  d["N1.01"] and d["MT.27"]
t = 0.63389, df = 4.7787, p-value = 0.5552
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -6.40076 10.51389
sample estimates:
mean of x mean of y
95.95178  93.89521

> t.test(d["N1.01"], d["MT.19"])

      welch Two Sample t-test

data:  d["N1.01"] and d["MT.19"]
t = 3.254, df = 4.2699, p-value = 0.02842      # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 2.928411 32.013956
sample estimates:
mean of x mean of y
95.95178  78.48059

> t.test(d["N1.01"], d["MT.49"])

      welch Two Sample t-test

data:  d["N1.01"] and d["MT.49"]
t = -0.47898, df = 7.9956, p-value = 0.6448
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -3.868225  2.537768
sample estimates:
mean of x mean of y
95.95178  96.61701
```

Zell-Zell-Kontakte MT-17-353 und MT-19-378 nach 6h

```
> d <- read.table(file="d_normal245_6h_v2.txt", sep="\t", dec=".", header=TRUE)
> d <- read.table(file="d_normal245_4h_v2.txt", sep="\t", dec=".", header=TRUE)

> Messdaten
      N1.01      MT.17      MT.27      MT.19      MT.49
1 95.91837 98.36066 98.11321 68.51852 98.24561
2 95.90164 94.54545 96.22642 36.11111 97.08738
3 98.05825 87.75510 96.36364 58.53659 95.61404
4 89.32039 95.04950 93.13725 50.00000 98.03922
5 89.77273 95.16129 96.61017 61.36364 96.33028

> t.test(d["N1.01"], d["MT.17"])
```

```
welch Two Sample t-test
data: d["N1.01"] and d["MT.17"]
t = -0.1527, df = 7.9962, p-value = 0.8824
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -6.120943  5.360689
sample estimates:
mean of x mean of y
 93.79427  94.17440

> t.test(d["N1.01"],d["MT.27"])

welch Two Sample t-test
data: d["N1.01"] and d["MT.27"]
t = -1.1739, df = 5.5955, p-value = 0.288
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -7.166513  2.574790
sample estimates:
mean of x mean of y
 93.79427  96.09014

> t.test(d["N1.01"],d["MT.19"])

welch Two Sample t-test
data: d["N1.01"] and d["MT.19"]
t = 6.6653, df = 4.8118, p-value = 0.001331      #hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 23.71218 54.06443
sample estimates:
mean of x mean of y
 93.79427  54.90597

> t.test(d["N1.01"],d["MT.49"])

welch Two Sample t-test
data: d["N1.01"] and d["MT.49"]
t = -1.7688, df = 4.6264, p-value = 0.1419
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -8.137545  1.599488
sample estimates:
mean of x mean of y
 93.79427  97.06330
```

A.1.3. MT-42-279, MT-43-286 und MT-43-287

T-Test MT-42-279 und MT-43-286/287 Längenwachstum

[Workspace loaded from [G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/Streckenwachstum_ste-7-caax_Dste-7_HG/.RData](#)]

```
> d <- read.table(file="d_Streckenwachstum_MT-42_MT-43.txt", sep="\t", dec=".", header=TRUE)
```

> Messwerte

	N1.01	N3.15	MT.42.279	MT.44.420	MT.43.286	MT.43.287	MT.45.423
1	95.33333	32.00000	91.33333	91.00000	76.66667	79.66667	87.66667
2	92.33333	29.66667	85.33333	89.66667	77.00000	73.66667	90.33333
3	102.66667	32.00000	89.33333	91.00000	75.66667	69.66667	86.66667
4	98.33333	34.66667	89.00000	88.33333	70.66667	79.66667	86.66667
5	98.33333	25.00000	91.66667	88.66667	69.33333	77.00000	88.00000

WT mit Teststämmen vergleichen

```
> t.test(d["N1.01"], d["N3.15"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["N3.15"]
t = 28.189, df = 7.971, p-value = 2.86e-09 # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 61.27071 72.19595
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.40000 30.66667
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.42.279"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.42.279"]
t = 3.9134, df = 6.9035, p-value = 0.005959 # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 3.178662 12.954671
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.40000 89.33333
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.44.420"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.44.420"]
t = 4.2289, df = 4.8402, p-value = 0.008867 # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 2.959752 12.373581
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.40000 89.73333
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.43.286"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.43.286"]
t = 9.9843, df = 7.9614, p-value = 8.889e-06 # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 18.09344 28.97322
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.40000 73.86667
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.43.287"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.43.287"]
t = 8.3293, df = 7.9121, p-value = 3.482e-05 # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 15.51201 27.42133
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.40000 75.93333
```

```

> t.test(d["N1.01"],d["MT.45.423"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.45.423"]
t = 5.1534, df = 5.1873, p-value = 0.003241 # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 4.829131 14.237536
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.40000  87.86667

MT-42-279 mit Teststämmen vergleichen

> t.test(d["MT.42.279"],d["N3.15"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.42.279"] and d["N3.15"]
t = 29.665, df = 7.1421, p-value = 9.614e-09 # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 54.00905 63.32428
sample estimates:
mean of x mean of y
 89.33333  30.66667

> t.test(d["MT.42.279"],d["MT.44.420"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.42.279"] and d["MT.44.420"]
t = -0.31689, df = 5.8621, p-value = 0.7623
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -3.506371  2.706371
sample estimates:
mean of x mean of y
 89.33333  89.73333

> t.test(d["MT.42.279"],d["MT.43.286"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.42.279"] and d["MT.43.286"]
t = 7.8701, df = 7.1784, p-value = 8.854e-05 # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 10.84289 20.09045
sample estimates:
mean of x mean of y
 89.33333  73.86667
> t.test(d["MT.42.279"],d["MT.43.287"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.42.279"] and d["MT.43.287"]
t = 6.0235, df = 6.4836, p-value = 0.0007084 # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
  8.0535 18.7465
sample estimates:
mean of x mean of y
 89.33333  75.93333

> t.test(d["MT.42.279"],d["MT.45.423"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.42.279"] and d["MT.45.423"]
t = 1.1154, df = 6.5113, p-value = 0.3041
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -1.690445  4.623779
sample estimates:
mean of x mean of y
 89.33333  87.86667

```

MT-43-286/287 mit N3-15 vergleichen

```
> t.test(d["MT.43.286"],d["N3.15"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.43.286"] and d["N3.15"]
t = 18.912, df = 7.9993, p-value = 6.326e-08      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 37.93244 48.46756
sample estimates:
mean of x mean of y
 73.86667  30.66667

> t.test(d["MT.43.287"],d["N3.15"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.43.287"] and d["N3.15"]
t = 18.028, df = 7.7889, p-value = 1.246e-07      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 39.44918 51.08416
sample estimates:
mean of x mean of y
 75.93333  30.66667
```

MT-43-286 mit MT-43-287 vergleichen

```
> t.test(d["MT.43.286"],d["MT.43.287"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.43.286"] and d["MT.43.287"]
t = -0.8263, df = 7.7657, p-value = 0.4333
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -7.864674  3.731341
sample estimates:
mean of x mean of y
 73.86667  75.93333
```

T-Test MT-42-279 und MT-43-286/287 Bildung von Lufthyphen

```
[Workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/Lufthyphen_ste-7-caax/.RData]
> d <- read.table(file="d_MT-42_MT-43_Lufthyphen.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)
```

```
> Messwerte
      N1.01      N3.15      MT.42      MT.44 MT.43.286 MT.43.287      MT.45
1 13.66667 3.000000 14.00000 16.00000 8.333333 10.33333 14.66667
2 14.33333 3.333333 15.33333 15.00000 9.666667 11.33333 15.00000
3 17.00000 2.666667 18.00000 15.66667 10.00000 9.00000 14.66667
4 11.66667 2.333333 16.00000 15.66667 8.666667 10.66667 18.00000
5 12.66667 2.333333 13.66667 16.66667 8.666667 9.00000 13.66667
```

WT mit Teststämmen vergleichen

```
> t.test(d["N1.01"],d["N3.15"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["N3.15"]
t = 12.037, df = 4.3688, p-value = 0.0001628      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 8.648501 13.618165
sample estimates:
mean of x mean of y
13.86667  2.733333
```

```

> t.test(d["N1.01"],d["MT.42"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.42"]
t = -1.2857, df = 7.824, p-value = 0.2353
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -4.294212  1.227545
sample estimates:
mean of x mean of y
 13.86667  15.40000

> t.test(d["N1.01"],d["MT.44"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.44"]
t = -2.0481, df = 4.7117, p-value = 0.09933
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -4.4052805  0.5386138
sample estimates:
mean of x mean of y
 13.86667  15.80000

> t.test(d["N1.01"],d["MT.43.286"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.43.286"]
t = 4.9983, df = 5.0053, p-value = 0.004099          # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
  2.3322  7.2678
sample estimates:
mean of x mean of y
 13.86667  9.066667

> t.test(d["N1.01"],d["MT.43.287"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.43.287"]
t = 3.7382, df = 5.9717, p-value = 0.009727          # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
  1.309781  6.290219
sample estimates:
mean of x mean of y
 13.86667  10.06667

> t.test(d["N1.01"],d["MT.45"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.45"]
t = -1.1443, df = 7.6786, p-value = 0.2869
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -4.040077  1.373411
sample estimates:
mean of x mean of y
 13.86667  15.20000

N3-15 mit Teststämmen MT-43 vergleichen

> t.test(d["N3.15"],d["MT.43.286"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["MT.43.286"]
t = -16.794, df = 6.5588, p-value = 1.234e-06          # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -7.237393 -5.429273
sample estimates:
mean of x mean of y
 2.733333  9.066667

```

```
> t.test(d["N3.15"],d["MT.43.287"])

welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["MT.43.287"]
t = -14.57, df = 5.3603, p-value = 1.622e-05          # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -8.601441 -6.065226
sample estimates:
mean of x mean of y
 2.733333 10.066667
```

MT-43-286 mit MT-43-287 vergleichen

```
> t.test(d["MT.43.286"],d["MT.43.287"])

welch Two Sample t-test

data: d["MT.43.286"] and d["MT.43.287"]
t = -1.7678, df = 7.1393, p-value = 0.1196
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -2.332362  0.332362
sample estimates:
mean of x mean of y
 9.066667 10.066667
```

T-Test MT-42-279 und MT-43-286/287 Sporenbildung

```
[workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/Sporenbildung_ste-7_caax/.RData]
> d <- read.table(file="d_MT-42_MT-43_Sporenbildung.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)
```

```
> Messwerte
      N1.01      N3.15 MT.42.279 MT.44.420 MT.43.286 MT.43.287 MT.45.423
1 13.99733 0.998725 13.81925 19.85633 4.727812 3.726400 23.92000
2 14.21280 0.832650 13.57883 20.76067 6.301800 5.860667 26.84125
3 29.40050 1.100000 12.08347 29.90875 6.181200 7.611750 22.92150
4 34.11100 1.153250 11.87200 23.88150 4.865900 8.406562 30.06938
5 33.59950 1.182187 11.45138 22.73600 4.479250 10.112350 30.52500
```

WT mit Teststämmen vergleichen

```
> t.test(d["N1.01"],d["N3.15"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["N3.15"]
t = 5.2787, df = 4.0016, p-value = 0.006169          # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 11.38366 36.63807
sample estimates:
mean of x mean of y
25.064227 1.053362
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.42.279"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.42.279"]
t = 2.734, df = 4.088, p-value = 0.051
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.08685638 25.09333971
sample estimates:
mean of x mean of y
25.06423 12.56099
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.44.420"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.44.420"]
t = 0.33516, df = 5.1826, p-value = 0.7506
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -10.77705 14.04820
sample estimates:
mean of x mean of y
25.06423 23.42865
```



```

> t.test(d["N1.01"],d["MT.43.286"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.43.286"]
t = 4.3275, df = 4.0574, p-value = 0.01199      # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 7.150298 32.355771
sample estimates:
mean of x mean of y
25.064227  5.311192

> t.test(d["N1.01"],d["MT.43.287"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.43.287"]
t = 3.8308, df = 4.4616, p-value = 0.01517      # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 5.445548 30.395813
sample estimates:
mean of x mean of y
25.064227  7.143546

> t.test(d["N1.01"],d["MT.45.423"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.45.423"]
t = -0.37284, df = 4.9137, p-value = 0.7248
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-14.20640 10.62401
sample estimates:
mean of x mean of y
25.06423  26.85543

N3-15 mit MT-42 und MT-43 vergleichen

> t.test(d["N3.15"],d["MT.42.279"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["MT.42.279"]
t = -23.908, df = 4.1413, p-value = 1.352e-05    # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-12.82623 -10.18902
sample estimates:
mean of x mean of y
1.053362 12.560985

> t.test(d["N3.15"],d["MT.43.286"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["MT.43.286"]
t = -10.904, df = 4.2166, p-value = 0.0003017    # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-5.320347 -3.195313
sample estimates:
mean of x mean of y
1.053362  5.311192

> t.test(d["N3.15"],d["MT.43.287"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["MT.43.287"]
t = -5.5559, df = 4.0269, p-value = 0.005036     # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-9.125619 -3.054748
sample estimates:
mean of x mean of y
1.053362  7.143546

```

MT-43-286 gegen MT-43-287

```
> t.test(d["MT.43.286"],d["MT.43.287"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.43.286"] and d["MT.43.287"]
t = -1.5794, df = 4.9767, p-value = 0.1754
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -4.818872  1.154166
sample estimates:
mean of x mean of y
 5.311192  7.143546
```

T-Test abhängige Stichproben Keimlingsinteraktionen nach 4 und 6h MT-42-279

[workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/Keimlingsinteraktionen_MT-42/.RData]

```
> wt1 = c(88.1,92.6,96.8)
> wt1
[1] 88.1 92.6 96.8
> wt2 = c(95.4,98.2,100)
> wt2
[1] 95.4 98.2 100.0
> N3.15.1=c(0,3.7,1.7)
> N3.15.1
[1] 0.0 3.7 1.7
> N3.15.2=c(0,0,1.8)
> N3.15.2
[1] 0.0 0.0 1.8
> MT.42.1=c(17.6,1.8,22.9)
> MT.42.1
[1] 17.6 1.8 22.9
> MT.42.2=c(8.5,7.3,8.1)
> MT.42.2
[1] 8.5 7.3 8.1
> MT.44.1=c(38.6,43.8,61.5)
> MT.44.1
[1] 38.6 43.8 61.5
> MT.44.2=c(88,65,77.5)
> MT.44.2
[1] 88.0 65.0 77.5
> MT.45.1=c(48.2,40.7,21.8)
> MT.45.1
[1] 48.2 40.7 21.8
> MT.45.2=c(39.7,43.7,28.3)
> MT.45.2
[1] 39.7 43.7 28.3
> t.test(wt1,wt2,paired=TRUE)

Paired t-test

data: wt1 and wt2
t = -4.5124, df = 2, p-value = 0.04577 # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -10.4838296 -0.2495038
sample estimates:
mean of the differences
 -5.366667

> t.test(N3.15.1,N3.15.2, paired = TRUE)

Paired t-test

data: N3.15.1 and N3.15.2
t = 0.95974, df = 2, p-value = 0.4385
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -4.17975  6.57975
sample estimates:
mean of the differences
 1.2
```

```
> t.test(MT.42.1,MT.42.2, paired = TRUE)

Paired t-test

data: MT.42.1 and MT.42.2
t = 1.0146, df = 2, p-value = 0.4171
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -19.87588  32.14254
sample estimates:
mean of the differences
      6.133333

> t.test(MT.44.1,MT.44.2, paired = TRUE)

Paired t-test

data: MT.44.1 and MT.44.2
t = -2.7821, df = 2, p-value = 0.1086
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -73.51025  15.77691
sample estimates:
mean of the differences
     -28.86667

> t.test(MT.45.1,MT.45.2, paired = TRUE)

Paired t-test

data: MT.45.1 and MT.45.2
t = -0.073571, df = 2, p-value = 0.948
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -19.82762  19.16095
sample estimates:
mean of the differences
     -0.3333333
```

Keimlingsinteraktionen MT-42-279 nach 4h

[workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/keimlingsinteraktionen_MT-42/.RData]

```
> d <- read.table(file="d_MT-42_Interaktionen_4h.txt", sep="\t", dec=".", header=TRUE)

> Messdaten
      N1.01      N3.15 MT.42.279 MT.44.420 MT.45.423
1 88.07339 0.000000 17.857143  38.57143  48.21429
2 92.59259 3.738318  1.834862  43.80952  40.74074
3 96.82540 1.709402 22.935780  61.46789  21.81818
> t.test(d["N1.01"],d["N3.15"])
```

WT mit Teststämmen vergleichen

```
Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["N3.15"]
t = 32.996, df = 2.7077, p-value = 0.0001316      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 81.37582 99.98662
sample estimates:
mean of x mean of y
92.497128  1.815906

> t.test(d["N1.01"],d["MT.42.279"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.42.279"]
t = 11.442, df = 2.6164, p-value = 0.002634      # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 54.59021 101.98552
sample estimates:
mean of x mean of y
92.49713  14.20926
```

```

> t.test(d["N1.01"],d["MT.44.420"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.44.420"]
t = 6.0422, df = 2.5232, p-value = 0.01467          # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 18.36462 70.73041
sample estimates:
mean of x mean of y
 92.49713  47.94961

> t.test(d["N1.01"],d["MT.45.423"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.45.423"]
t = 6.7348, df = 2.4096, p-value = 0.01289          # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 25.26854 85.87691
sample estimates:
mean of x mean of y
 92.49713  36.92440

N3-15 mit Teststämmen vergleichen

> t.test(d["N3.15"],d["N1.01"])

welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["N1.01"]
t = -32.996, df = 2.7077, p-value = 0.0001316      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-99.98662 -81.37582
sample estimates:
mean of x mean of y
 1.815906 92.497128

> t.test(d["N3.15"],d["MT.42.279"])

welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["MT.42.279"]
t = -1.9215, df = 2.1154, p-value = 0.1876
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-38.74261 13.95590
sample estimates:
mean of x mean of y
 1.815906 14.209262

> t.test(d["N3.15"],d["MT.44.420"])

welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["MT.44.420"]
t = -6.5811, df = 2.0973, p-value = 0.01976        # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-74.99340 -17.27401
sample estimates:
mean of x mean of y
 1.815906 47.949614

> t.test(d["N3.15"],d["MT.45.423"])

welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["MT.45.423"]
t = -4.4278, df = 2.0757, p-value = 0.04428        # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-68.06055 -2.15644
sample estimates:
mean of x mean of y
 1.815906 36.924403

```

MT-42-279 mit MT-44-420 und MT-45-423 vergleichen

```
> t.test(d["MT.42.279"],d["MT.44.420"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.42.279"] and d["MT.44.420"]
t = -3.5885, df = 3.9711, p-value = 0.02328      # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -59.920417 -7.560288
sample estimates:
mean of x mean of y
 14.20926  47.94961

> t.test(d["MT.42.279"],d["MT.45.423"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.42.279"] and d["MT.45.423"]
t = -2.2476, df = 3.8337, p-value = 0.09078
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -51.261038  5.830756
sample estimates:
mean of x mean of y
 14.20926  36.92440
```

Keimlingsinteraktionen MT-42-279 nach 6h

[workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/keimlingsinteraktionen_MT-42/.RData]

```
> d <- read.table(file="d_MT-42_Interaktionen_6h.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)
> Messdaten
      N1.01      N3.15 MT.42.279 MT.44.420 MT.45.423
1  95.38462  0.000000  8.547009  88.00000  39.66942
2  98.19820  0.000000  7.272727  65.04065  43.26923
3 100.00000  1.785714  8.056872  77.46479  28.30189
```

WT mit Teststämmen vergleichen

```
> t.test(d["N1.01"],d["N3.15"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["N3.15"]
t = 66.213, df = 2.7566, p-value = 1.699e-05      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 92.34833 102.18307
sample estimates:
mean of x mean of y
97.8609379  0.5952381

> t.test(d["N1.01"],d["MT.42.279"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.42.279"]
t = 64.524, df = 2.3037, p-value = 8.377e-05      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 84.60424 95.19990
sample estimates:
mean of x mean of y
97.860938  7.958869

> t.test(d["N1.01"],d["MT.44.420"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.44.420"]
t = 3.1058, df = 2.1636, p-value = 0.08139
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -6.090376 48.141959
sample estimates:
mean of x mean of y
97.86094  76.83515
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.45.423"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.45.423"]
t = 12.915, df = 2.3518, p-value = 0.003086      # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 43.17481 78.38671
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.86094  37.08018
```

N3-15 mit Teststämmen vergleichen

```
> t.test(d["N3.15"],d["N1.01"])

welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["N1.01"]
t = -66.213, df = 2.7566, p-value = 1.699e-05    # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -102.18307 -92.34833
sample estimates:
mean of x mean of y
 0.5952381 97.8609379
```

```
> t.test(d["N3.15"],d["MT.42.279"])

welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["MT.42.279"]
t = -10.498, df = 3.3507, p-value = 0.001117     # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -9.469413 -5.257850
sample estimates:
mean of x mean of y
 0.5952381 7.9588693
```

```
> t.test(d["N3.15"],d["MT.44.420"])

welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["MT.44.420"]
t = -11.444, df = 2.0322, p-value = 0.007126     # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -104.47309 -48.00673
sample estimates:
mean of x mean of y
 0.5952381 76.8351464
```

```
> t.test(d["N3.15"],d["MT.45.423"])

welch Two Sample t-test

data: d["N3.15"] and d["MT.45.423"]
t = -8.0194, df = 2.0696, p-value = 0.01374     # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -55.44240 -17.52748
sample estimates:
mean of x mean of y
 0.5952381 37.0801797
```

MT-42-279 mit MT-44-420 und MT-45-423 vergleichen

```
> t.test(d["MT.42.279"],d["MT.44.420"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.42.279"] and d["MT.44.420"]
t = -10.364, df = 2.0125, p-value = 0.008989      # hoch signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -97.30046 -40.45210
sample estimates:
mean of x mean of y
 7.958869 76.835146

> t.test(d["MT.42.279"],d["MT.45.423"])

Welch Two Sample t-test

data: d["MT.42.279"] and d["MT.45.423"]
t = -6.4346, df = 2.0271, p-value = 0.02254      # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -48.346806 -9.895814
sample estimates:
mean of x mean of y
 7.958869 37.080180
```

A.1.4. MT-29-249 und MT-35-330

T-Test MT-29-249 und MT-35-330 Längenwachstum

[Workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/Streckenwachstum_ste-7-caax_wt_HG/.RData]

```
> d <- read.table(file="Daten_ste-7-caax_wt_HG.txt", sep="\t", dec=".", header=TRUE)
```

> Messwerte

```
      N1.01      MT.29      MT.36      MT.68      MT.35      MT.37      MT.67
1  95.33333  97.33333  101.33333  96.33333  88.33333  94.33333  93.00000
2  92.33333  97.00000  98.00000  93.33333  90.33333  95.66667  94.66667
3  102.66667  98.33333  103.00000  92.66667  86.33333  94.33333  96.00000
4  98.33333  97.33333  93.33333  92.00000  88.33333  97.66667  95.00000
5  98.33333  106.00000  107.66667  104.00000  97.00000  108.00000  105.00000
> t.test(d["N1.01"], d["MT.29"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.29"]
t = -0.74035, df = 7.9998, p-value = 0.4802
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -7.406563  3.806563
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.4      99.2
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.36"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.36"]
t = -1.1037, df = 7.2499, p-value = 0.305
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -10.216713  3.683379
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.4000  100.6667
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.68"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.68"]
t = 0.61826, df = 7.5505, p-value = 0.5546
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -4.799319  8.265985
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.40000  95.66667
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.35"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.35"]
t = 2.9043, df = 7.9632, p-value = 0.01986 # signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
  1.506019 13.160647
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.40000  90.06667
```

```
> t.test(d["N1.01"], d["MT.37"])
```

Welch Two Sample t-test

```
data: d["N1.01"] and d["MT.37"]
t = -0.19372, df = 6.9878, p-value = 0.8519
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -7.926562  6.726562
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.4      98.0
```



```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.67"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.67"]
t = 0.24383, df = 7.677, p-value = 0.8138
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -5.684757  7.018091
sample estimates:
mean of x mean of y
 97.40000  96.73333
```

T-Test MT-29-249 und MT-35-330 Bildung von Lufthyphen

```
> d <- read.table(file="d_MT-29_MT-35_Lufthyphen.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)
```

> Messwerte

	N1.01	MT.29.249	MT.36.300	MT.68.553	MT.35.330	MT.37.408	MT.67.552
1	13.66667	16.00000	12.66667	11.33333	7.000000	12.00000	14.00000
2	14.33333	12.33333	11.33333	12.33333	6.666667	12.33333	13.33333
3	17.00000	13.33333	12.00000	13.00000	4.333333	13.66667	12.00000
4	11.66667	11.33333	11.66667	12.33333	6.666667	10.33333	13.00000
5	12.66667	10.33333	11.33333	11.00000	5.000000	11.00000	10.00000

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.29.249"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.29.249"]
t = 0.90396, df = 7.9589, p-value = 0.3926
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -1.863946  4.263946
sample estimates:
mean of x mean of y
 13.86667  12.66667
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.36.300"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.36.300"]
t = 2.2031, df = 4.6052, p-value = 0.08343
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.4082804  4.5416137
sample estimates:
mean of x mean of y
 13.86667  11.80000
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.68.553"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.68.553"]
t = 1.914, df = 5.2706, p-value = 0.1108
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.602072  4.335405
sample estimates:
mean of x mean of y
 13.86667  12.00000
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.35.330"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.35.330"]
t = 7.5641, df = 6.467, p-value = 0.000193      # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
  5.411255 10.455412
sample estimates:
mean of x mean of y
 13.86667  5.933333
```

```
> t.test(d["N1.01"],d["MT.37.408"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.37.408"]
t = 1.8677, df = 6.7694, p-value = 0.1055
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.5496864  4.5496864
sample estimates:
mean of x mean of y
 13.86667  11.86667

> t.test(d["N1.01"],d["MT.67.552"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.67.552"]
t = 1.2268, df = 7.5081, p-value = 0.257
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -1.261812  4.061812
sample estimates:
mean of x mean of y
 13.86667  12.46667
```

T-Test MT-42-279 und MT-43-286/287 Sporenbildung

```
> d <- read.table(file="d_MT-29_MT-35.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)

> Messwerte
      N1.01 MT.29.249 MT.36.300 MT.68.553 MT.35.330 MT.37.408 MT.67.552
1 13.99733  27.33333  24.12167  20.92500  23.78750  31.02500  24.02850
2 14.21280  23.95400  28.45500  23.24350  27.20000  32.35808  25.16250
3 29.40050  26.83450  33.55083  18.91750  29.39100  30.92513  26.48583
4 34.11100  29.78250  25.08650  25.43175  29.76337  31.83775  29.90875
5 33.59950  38.75850  32.09625  38.75850  29.96300  27.74250  38.24150

> t.test(d["N1.01"],d["MT.29.249"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.29.249"]
t = -0.81997, df = 6.262, p-value = 0.4423
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -16.877665   8.340985
sample estimates:
mean of x mean of y
 25.06423  29.33257

> t.test(d["N1.01"],d["MT.36.300"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.36.300"]
t = -0.73222, df = 5.3005, p-value = 0.4951
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -16.016178   8.820532
sample estimates:
mean of x mean of y
 25.06423  28.66205

> t.test(d["N1.01"],d["MT.68.553"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.68.553"]
t = -0.068127, df = 7.5084, p-value = 0.9475
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -13.77896  12.99691
sample estimates:
mean of x mean of y
 25.06423  25.45525

> t.test(d["N1.01"],d["MT.35.330"])
```

```

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.35.330"]
t = -0.62966, df = 4.5252, p-value = 0.5593
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-15.418705   9.505209
sample estimates:
mean of x mean of y
25.06423 28.02097

> t.test(d["N1.01"],d["MT.37.408"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.37.408"]
t = -1.237, df = 4.2495, p-value = 0.28
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-18.245421   6.818491
sample estimates:
mean of x mean of y
25.06423 30.77769

> t.test(d["N1.01"],d["MT.67.552"])

welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.67.552"]
t = -0.70873, df = 6.3126, p-value = 0.5038
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-16.327863   8.925483
sample estimates:
mean of x mean of y
25.06423 28.76542

> t.test(d["MT.29.249"],d["MT.35.330"])

welch Two Sample t-test

data: d["MT.29.249"] and d["MT.35.330"]
t = 0.47038, df = 5.6284, p-value = 0.6558
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-5.621931   8.245114
sample estimates:
mean of x mean of y
29.33257 28.02097

> t.test(d["MT.36.300"],d["MT.37.408"])

welch Two Sample t-test

data: d["MT.36.300"] and d["MT.37.408"]
t = -1.0445, df = 5.4442, p-value = 0.3404
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-7.197134   2.965851
sample estimates:
mean of x mean of y
28.66205 30.77769

> t.test(d["MT.68.553"],d["MT.67.552"])

welch Two Sample t-test

data: d["MT.68.553"] and d["MT.67.552"]
t = -0.76257, df = 7.3356, p-value = 0.4695
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-13.480131   6.859798
sample estimates:
mean of x mean of y
25.45525 28.76542

```

T-Test abhängige Stichproben Keimlingsinteraktionen nach 4 und 6h MT-29-249 und MT-35-330

```

wt1:4h
wt2:6h

> wt1 = c(82.1,90.5,95)
> wt1
[1] 82.1 90.5 95.0
> wt2 = c(96.5,93.2,98.2)
> wt2
[1] 96.5 93.2 98.2
> MT.29.1=c(95.9,93.4,100)
> MT.29.1
[1] 95.9 93.4 100.0
> MT.29.2=c(100,100,98.3)
> MT.29.2
[1] 100.0 100.0 98.3
> MT.36.1=c(100,94.9,100)
> MT.36.1
[1] 100.0 94.9 100.0
> MT.36.2=c(97,97.3,98.7)
> MT.36.2
[1] 97.0 97.3 98.7
> MT.68.1=c(96.7,89.6,96.5)
> MT.68.1
[1] 96.7 89.6 96.5
> MT.68.2=c(94.4,92.2,98.2)
> MT.68.2
[1] 94.4 92.2 98.2
> MT.35.1=c(22.2,19.1,29.7)
> MT.35.1
[1] 22.2 19.1 29.7
> MT.35.2=c(23.7,19.4,14.4)
> MT.35.2
[1] 23.7 19.4 14.4
> MT.37.1=c(81.9,62.8,61.2)
> MT.37.1
[1] 81.9 62.8 61.2
> MT.37.2=c(78.9,71.3,87.7)
> MT.37.2
[1] 78.9 71.3 87.7
> MT.67.1=c(89.1,94.5,98.9)
> MT.67.1
[1] 89.1 94.5 98.9
> MT.67.2=c(93.5,100,100)
> MT.67.2
[1] 93.5 100.0 100.0
> t.test(wt1,wt2,paired=TRUE)

Paired t-test

data: wt1 and wt2
t = -1.7717, df = 2, p-value = 0.2185
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -23.200197  9.666863
sample estimates:
mean of the differences
 -6.766667

> t.test(MT.29.1,MT.29.2, paired = TRUE)

Paired t-test

data: MT.29.1 and MT.29.2
t = -1.2203, df = 2, p-value = 0.3467
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -13.577294  7.577294
sample estimates:
mean of the differences
 -3

> t.test(MT.36.1,MT.36.2, paired = TRUE)

Paired t-test

data: MT.36.1 and MT.36.2
t = 0.3973, df = 2, p-value = 0.7295
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -6.225466  7.492133
sample estimates:
mean of the differences
 0.6333333

```

```
> t.test(MT.68.1,MT.68.2, paired = TRUE)

    Paired t-test

data:  MT.68.1 and MT.68.2
t = -0.4427, df = 2, p-value = 0.7013
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -7.146093  5.812759
sample estimates:
mean of the differences
 -0.6666667

> t.test(MT.35.1,MT.35.2, paired = TRUE)

    Paired t-test

data:  MT.35.1 and MT.35.2
t = 0.83162, df = 2, p-value = 0.4931
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -18.78208  27.78208
sample estimates:
mean of the differences
 4.5

> t.test(MT.37.1,MT.37.2, paired = TRUE)

    Paired t-test

data:  MT.37.1 and MT.37.2
t = -1.2425, df = 2, p-value = 0.34
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -47.60299  26.26966
sample estimates:
mean of the differences
 -10.66667

> t.test(MT.67.1,MT.67.2, paired = TRUE)

    Paired t-test

data:  MT.67.1 and MT.67.2
t = -2.7735, df = 2, p-value = 0.1091
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -9.354926  2.021593
sample estimates:
mean of the differences
 -3.666667
```

Keimlingsinteraktionen MT-29-249 und MT-35-330 nach 4h

```
> d <- read.table(file="d_Interaktionen_MT-29_MT-
35_4h.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)

> Messdaten
      N1.01 MT.29.249 MT.36.300 MT.68.553 MT.35.330 MT.37.405 MT.67.552
1  82.90598  95.90164 100.00000  96.69421  22.22222  81.87500  89.09091
2  90.51724  93.44262  94.85294  89.56522  19.13043  62.79070  94.54545
3  95.00000 100.00000 100.00000  96.52174  29.66102  61.15702  98.90110
> t.test(d["N1.01"],d["MT.29.249"])
```

WT mit Teststämmen vergleichen

```
Welch Two Sample t-test

data:  d["N1.01"] and d["MT.29.249"]
t = -1.737, df = 3.0811, p-value = 0.1784
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -19.562447  5.615089
sample estimates:
mean of x mean of y
 89.47441  96.44809
```

```

> t.test(d["N1.01"],d["MT.36.300"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.36.300"]
t = -2.2447, df = 2.895, p-value = 0.1137
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -21.560739  3.940928
sample estimates:
mean of x mean of y
 89.47441  98.28431

> t.test(d["N1.01"],d["MT.68.553"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.68.553"]
t = -1.1289, df = 3.4801, p-value = 0.3307
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -17.283996  7.712032
sample estimates:
mean of x mean of y
 89.47441  94.26039

> t.test(d["N1.01"],d["MT.35.330"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.35.330"]
t = 13.958, df = 3.9421, p-value = 0.0001674 # höchst Signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 52.63737 78.96900
sample estimates:
mean of x mean of y
 89.47441  23.67122

> t.test(d["N1.01"],d["MT.37.405"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.37.405"]
t = 2.7714, df = 3.0441, p-value = 0.06835
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -2.899495 44.633163
sample estimates:
mean of x mean of y
 89.47441  68.60757

> t.test(d["N1.01"],d["MT.67.552"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.67.552"]
t = -1.0387, df = 3.8235, p-value = 0.3601
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -17.512215  8.102723
sample estimates:
mean of x mean of y
 89.47441  94.17915

```

Keimlingsinteraktionen MT-29-249 und MT-35-330 nach 6h

[Workspace loaded from G:/NEU_ab2016/JuliaI/R/Keimlingsinteraktionen_MT-29_MT-35/.RData]

```

> d <- read.table(file="d_Interaktionen_MT-29_MT-35_6h.txt",sep="\t",dec=".",header=TRUE)

```

> Messdaten

	N1.01	MT.29.249	MT.36.300	MT.68.553	MT.35.330	MT.37.405	MT.67.552
1	96.55172	100.00000	97.03704	94.39252	23.72881	78.94737	93.54839
2	93.22034	100.00000	97.31544	92.52336	19.37984	71.30984	100.00000
3	98.19820	98.27586	98.68421	98.24561	14.41441	87.67123	100.00000

```

> t.test(d["N1.01"],d["MT.29.249"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.29.249"]
t = -2.184, df = 2.602, p-value = 0.1305
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -8.903253  2.032853
sample estimates:
mean of x mean of y
95.99009 99.42529

> t.test(d["N1.01"],d["MT.36.300"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.36.300"]
t = -1.0895, df = 2.4765, p-value = 0.3705
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -7.267749  3.890134
sample estimates:
mean of x mean of y
95.99009 97.67889

> t.test(d["N1.01"],d["MT.68.553"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.68.553"]
t = 0.41947, df = 3.9238, p-value = 0.6968
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -5.308504  7.181010
sample estimates:
mean of x mean of y
95.99009 95.05383

> t.test(d["N1.01"],d["MT.35.330"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.35.330"]
t = 25.076, df = 3.0889, p-value = 0.0001133 # höchst signifikant
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 67.22355 86.40791
sample estimates:
mean of x mean of y
95.99009 19.17436

> t.test(d["N1.01"],d["MT.37.405"])

Welch Two Sample t-test

data: d["N1.01"] and d["MT.37.405"]
t = 3.3711, df = 2.3803, p-value = 0.06092
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -1.66017 35.02139
sample estimates:
mean of x mean of y
95.99009 79.30948

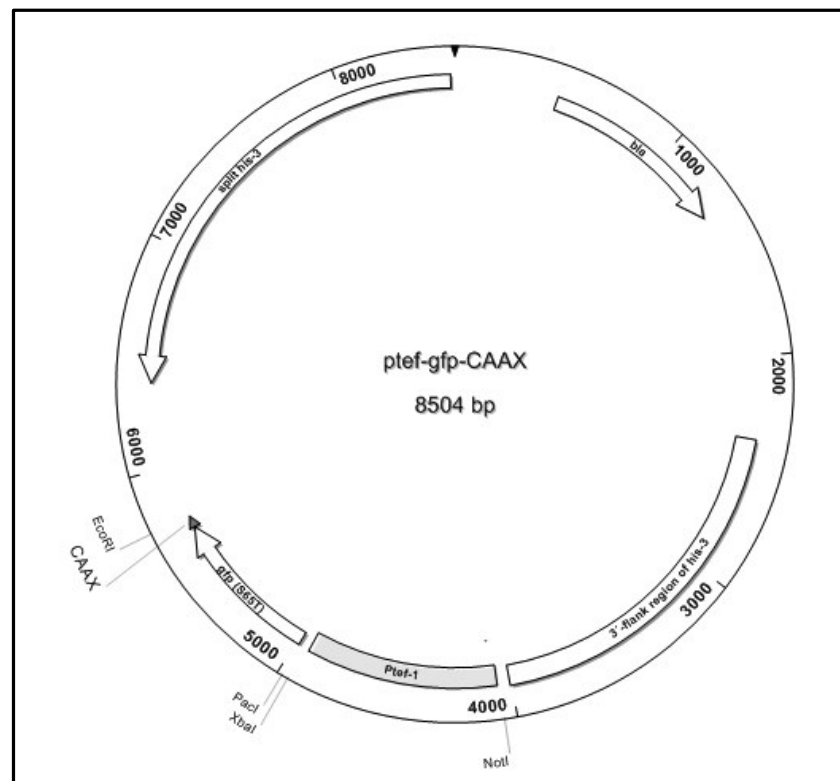
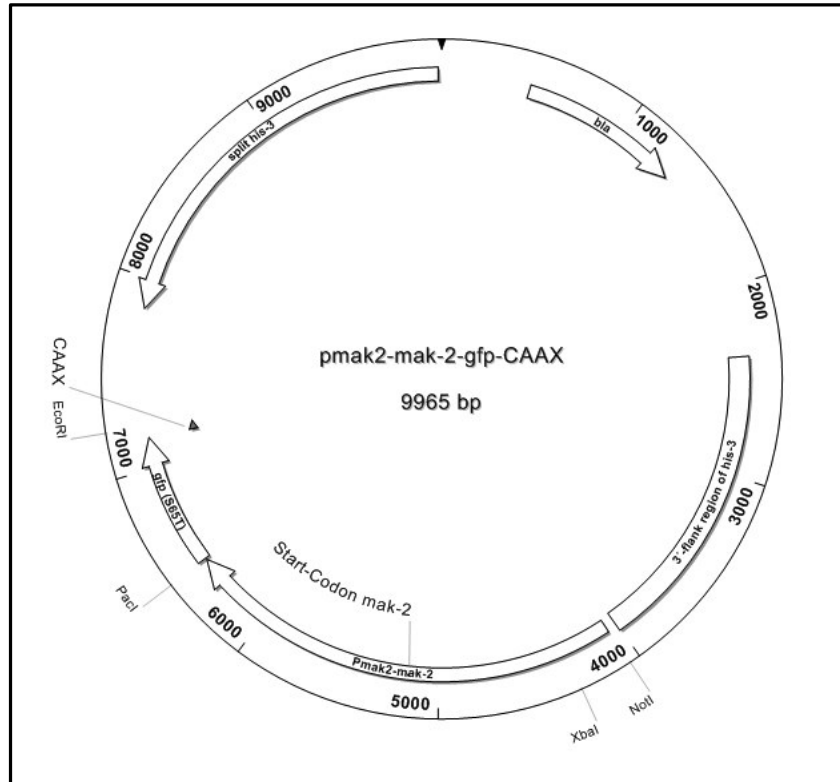
> t.test(d["N1.01"],d["MT.67.552"])

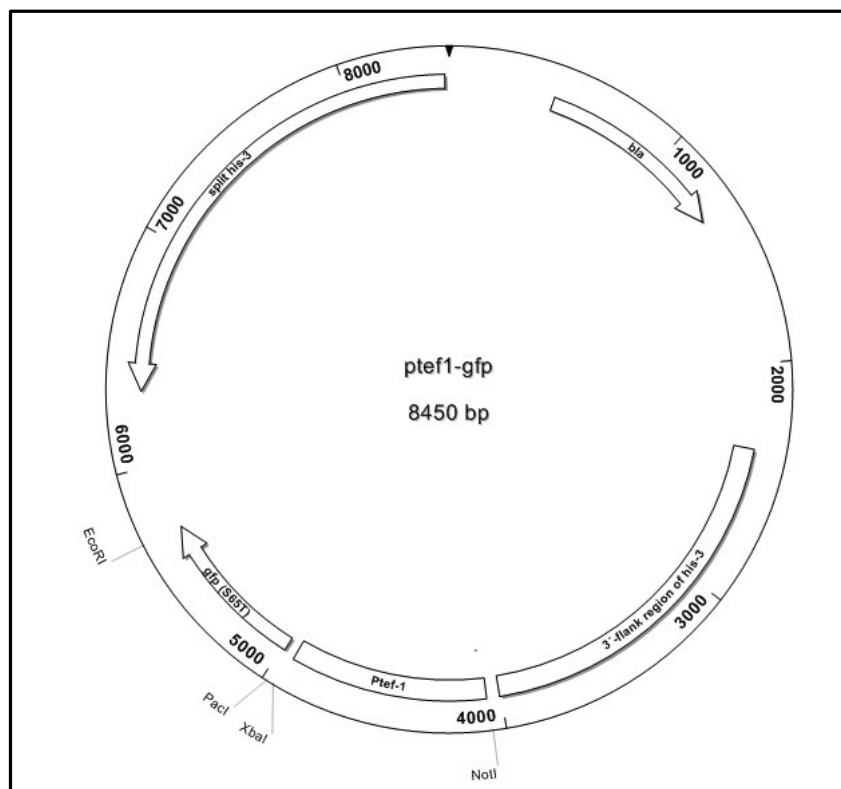
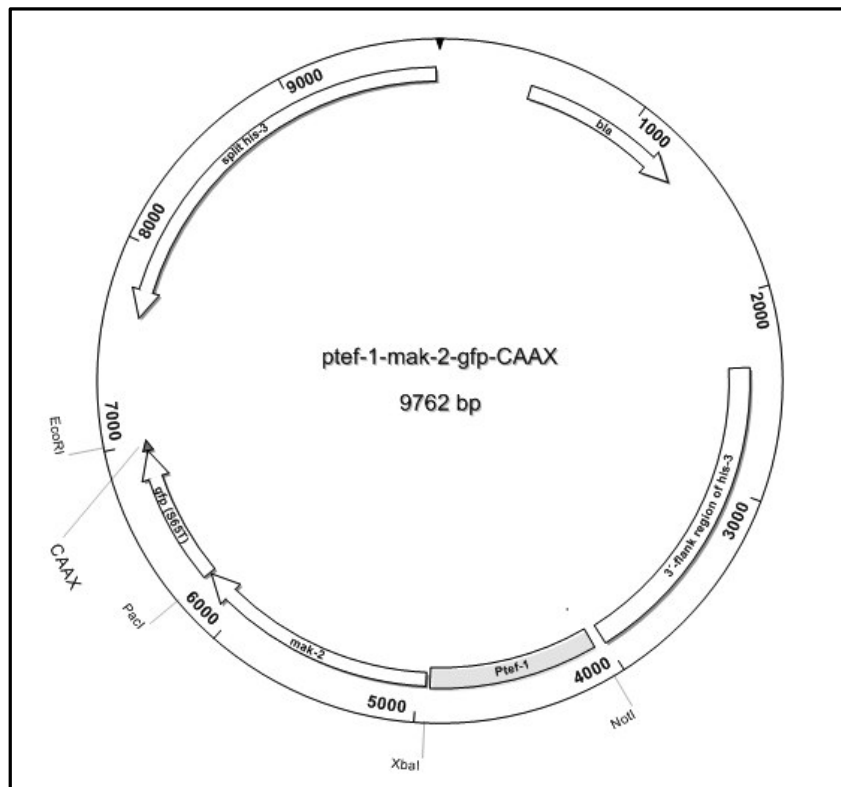
Welch Two Sample t-test

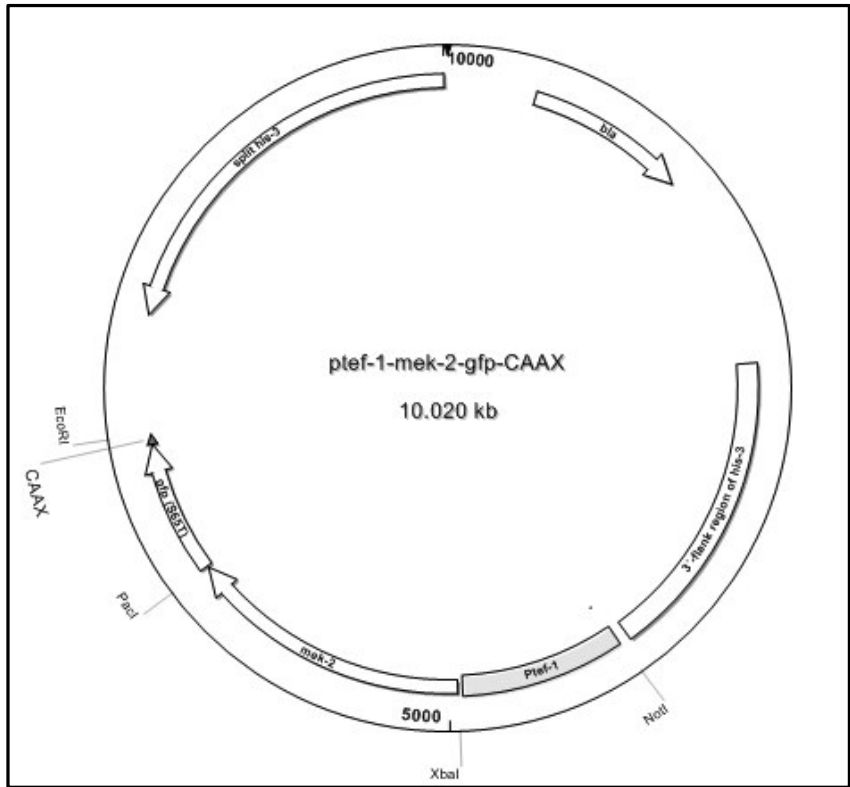
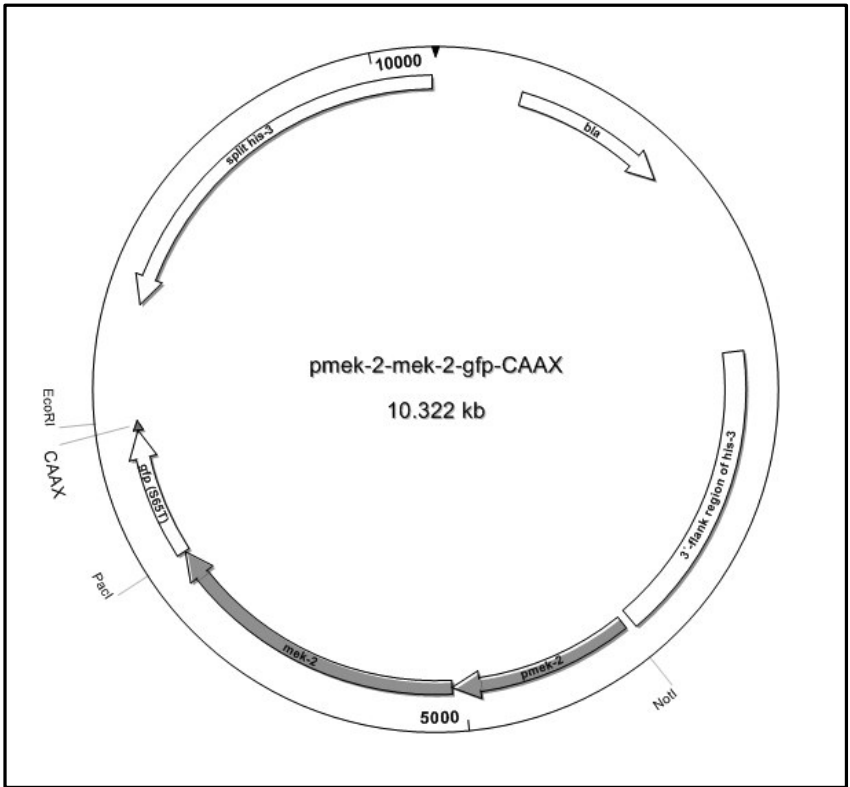
data: d["N1.01"] and d["MT.67.552"]
t = -0.71469, df = 3.5262, p-value = 0.5192
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -9.482056  5.763305
sample estimates:
mean of x mean of y
95.99009 97.84946

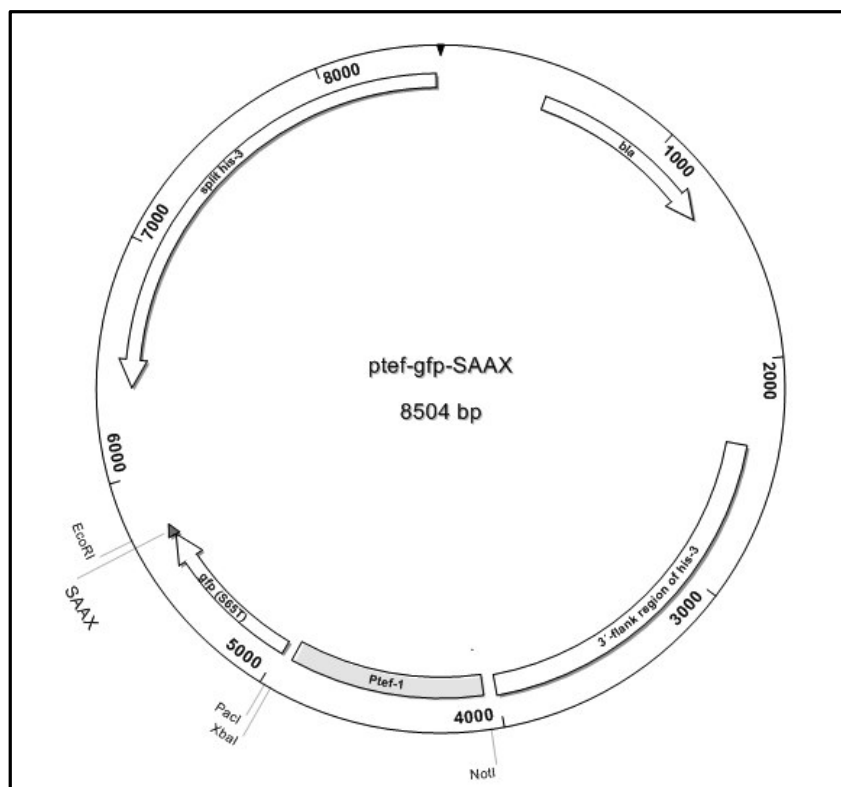
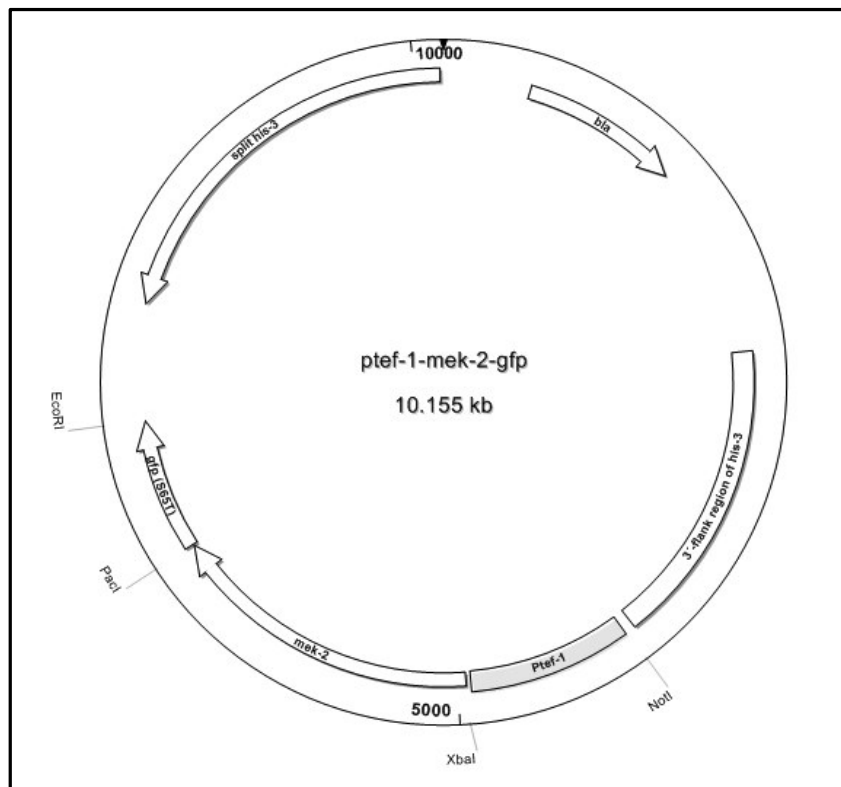
```

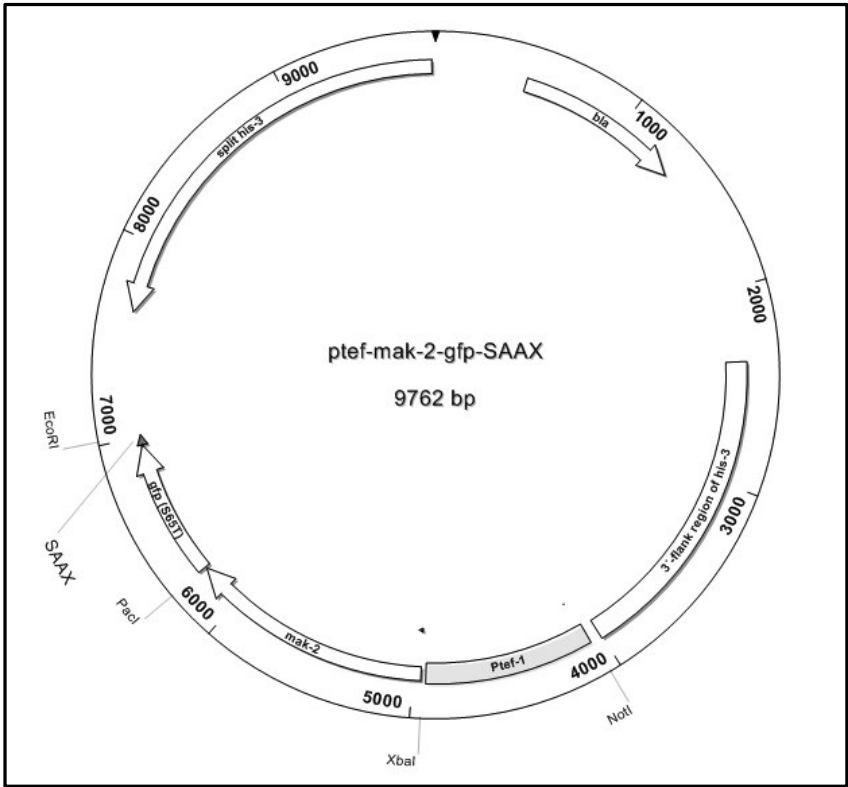
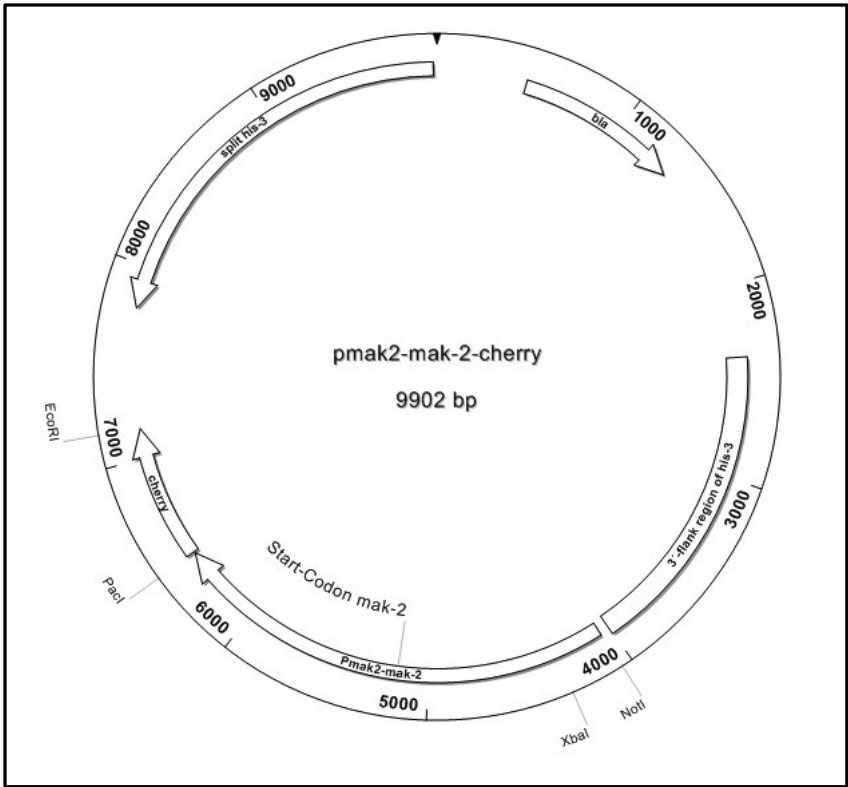
A.2. Plasmidkarten

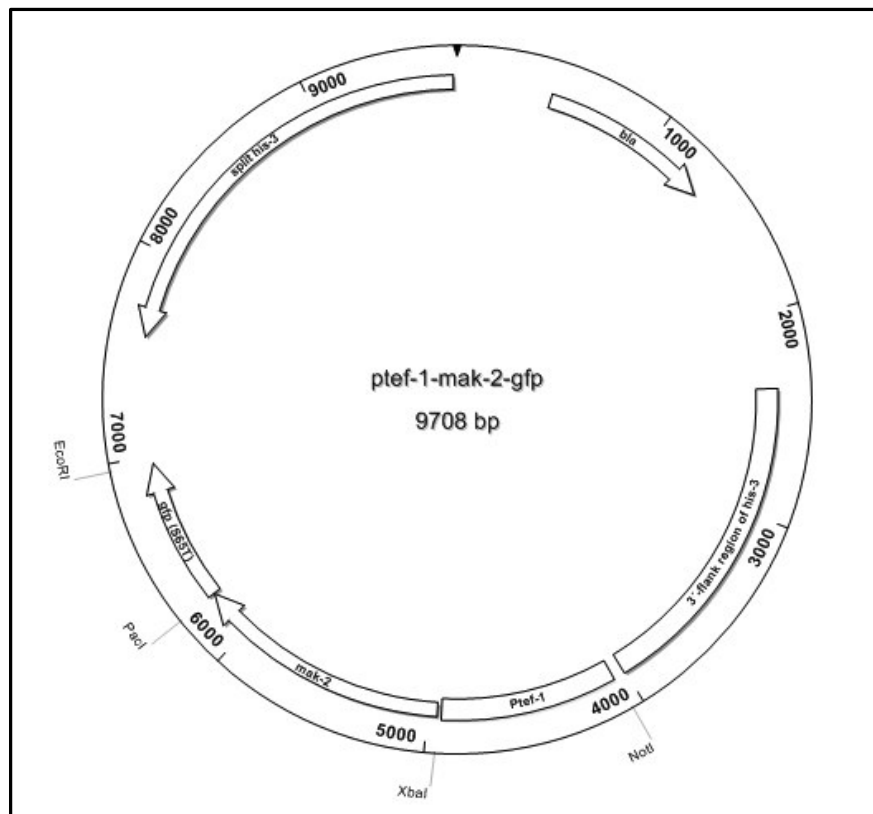












Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. André Fleißner für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe und an diesem spannenden Thema zu promovieren. Durch seine Begeisterungsfähigkeit und klare, wertschätzende Kommunikation habe ich mich jederzeit hervorragend betreut gefühlt, mit einem festen Fundament und gleichzeitig dem nötigen Freiraum für eine fachliche und persönliche Entwicklung.

Mein großer Dank gilt auch Prof. Dr. Norbert Käufer für die freundliche Übernahme des Ko-referats und für seine wissenschaftliche Begleitung seit den frühen Zeiten meines Studiums. Danke für viele Denkanstöße, wertvolle Diskussionen und den festen Glauben, dass Wissenschaft zählt.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Stephan Seiler und Dr. Anne Dettmann für fruchtbare Kollaborationen und die wertvollen Momente am Spinning-Disk-Mikroskop in der Studentenstadt Göttingen.

Darüber hinaus gilt mein persönlicher Dank allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Genetik, die zu der angenehmen Arbeitsatmosphäre beitragen und beigetragen haben. Allen voran möchte ich hier Ulrike Brandt nennen, die mit ihrer frohen Natur und der Liebe zur Arbeit ein gutes Vorbild für mich ist. Darüber hinaus möchte ich mich auch bei allen Kollegen bedanken, die es mir durch ihre Rücksichtnahme und Kooperation (Verzicht auf gesundheitsgefährdende Chemikalien in einem von zwei Laboren) ermöglicht haben auch schwanger im Labor zu arbeiten. Vielen Dank in diesem Zusammenhang auch an Ulrike Brandt, Stephanie Herzog, Martin Weichert, Timo Schürg, Ewald Priegnitz, Marcel Schuhmann, Anja Letz, Hanna Lunding und alle anderen Kollegen die während meiner Schwangerschaften die ein oder andere DNA-Isolation für mich durchgeführt und Agarose-Gele beladen und fotografiert haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat. Ein ganz spezieller Dank gilt meiner Tochter Carina, die mir - während sie selber voll und ganz damit beschäftigt ist langsam erwachsen zu werden - besonders während der letzten Phase des intensiven Zusammenschreibens immer Verständnis entgegengebracht hat und voll hinter mir steht. Vielen Dank auch an meine Kinder Erik und Frida, die meinen Alltag mit ihren Ideen und ihrem Entdeckergeist bereichern. Ein sehr herzlicher Dank geht an meinen Mann Jan. Für das Korrekturlesen, die emotionale Aufbauarbeit und dafür, dass er in den letzten Monaten neben seinem regulären Job auch noch meinen Anteil aller anfallenden Arbeiten im Haus und Garten klaglos übernommen und eine wundervolle Kinderbetreuung gewährleistet hat. Ich hoffe, du kannst bald wieder aufhören, für unsere Kinder Vater und Mutter zu sein ;-)

"First to doubt, then to inquire, and then to discover"

-Henry Thomas Buckle-